

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Evaluación farmacocinética-farmacodinámica de un régimen terapéutico de marbofloxacina, como predictor de su eficacia, en mastitis caprina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Augusto Matías Lorenzutti

Directores

José Julio de Lucas Burneo

Nicolás Literio

Madrid, 2017



TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÁMICA DE
UN RÉGIMEN TERAPÉUTICO DE MARBOFLOXACINA, COMO
PREDICTOR DE SU EFICACIA, EN MASTITIS CAPRINA**

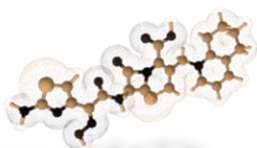
**Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por**

AUGUSTO MATÍAS LORENZUTTI

Directores

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA (Argentina)
Dr. Nicolás Javier Litterio**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Dr. José Julio de Lucas Burneo**



Madrid, *2015*

FACULTAD DE VETERINARIA

D. José Julio de Lucas Burneo, Prof. Contratado Doctor, del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y D. Nicolás Javier Litterio, Prof. Titular de Farmacología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba

C E R T I F I C A N

Que la memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Augusto Matias Lorenzutti, con el título *Evaluación farmacocinética/farmacodinámica de un régimen terapéutico de marbofloxacin, como predictor de su eficacia, en mastitis caprina*, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el laboratorio del Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (España) y en los campos de prácticas de la Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias de la Universidad Católica de Córdoba (Argentina).

Madrid, noviembre de 2015

Fdo. Jose J. de Lucas Burneo

Fdo. Nicolas J. Litterio

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos comienzan con mi círculo más íntimo... mi familia. Quiero agradecer muchísimo a Maguí, mi señora, que me brinda mucho amor, me apoya incondicionalmente en las buenas y en las malas, y me dio lo más importante de mi vida: mis hijos Tomás y Juan Cruz, a los que amo con toda mi alma y cambiaron mi vida para siempre desde que llegaron al mundo. Para mi mamá, que me ayudó a crecer, me dio su amor incondicional, supo criarme y cuidarme tras haber quedado viuda cuando yo tenía seis años. A mis tíos, primos y amigos que con su afecto y palabras de aliento me ayudan a seguir adelante. A mi papá y mis abuelos que están en el cielo y que en su momento me ayudaron a crecer y educarme, me dieron su amor y me alentaron a lograr mis metas. Todos ellos son mi sostén y motor que me impulsa a lograr todos mis objetivos en la vida.

Para mis colegas y compañeros de trabajo, para los integrantes de la Cátedra de Farmacología y Toxicología de la Universidad Católica de Córdoba: Juan Carlos Boggio, Nicolás Litterio, Martín Himelfarb y Pilar Zarazaga, que más que compañeros son mis amigos, y desde hace años compartimos el trabajo y nos apuntalamos mutuamente para crecer como grupo en lo profesional y lo humano. Gracias especiales a Juan Carlos Boggio, que formó este hermoso grupo y nos inició a mis compañeros y a mí en este doctorado, que constantemente nos impulsó a crecer, y que con aciertos y errores nos hizo crecer a todos, siempre con la noble intención de fomentar el desarrollo de su grupo de trabajo. Creo que él estaría orgulloso de vernos completar esta importante etapa de nuestras vidas.

A la Universidad Católica de Córdoba por permitirme realizar la fase experimental de mi tesis en las instalaciones del campo experimental, y de proveerme los animales, los insumos, el equipamiento y recurso humano para poder lograrlo. A la Universidad Complutense de Madrid, por haberme recibido como alumno de doctorado, es un gran honor poder obtener este título en esta casa de altos estudios. Además, gracias a los proyectos de la UCM y AECID mi doctorado y muchos otros pudieron ser posibles. Gracias a Julio de Lucas por ayudarme en la detección de gran parte de mis muestras, y a Manolo San Andrés por ayudarme con pequeñas grandes cosas en todo momento.

A mis directores, Julio de Lucas y Nicolás Litterio (los apellidos van en orden alfabético para que no se pongan celosos), por ayudarme tanto en la realización de mi tesis. He aprendido de los dos muchas cosas, que me servirán para desempeñarme como investigador en el futuro.

Quiero agradecer también a la Universidad Católica de Córdoba y la Universidad Nacional de Villa María por la ayuda económica que me otorgaron para poder culminar esta tesis.

A todos ellos ¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!! Porque sin su apoyo, enseñanza y aliento constantes, mi vida no sería la misma.

RESÚMEN

La demanda de leche de cabra ha aumentado en las últimas décadas, intensificándose su producción. Esto, unido a la escasa formación sanitaria de los productores, favorece el incremento de patologías infecciosas. La mastitis bacteriana, frecuentemente en forma subclínica, es un grave problema que no sólo afecta a la producción, sino también a la calidad y seguridad de la leche, genera pérdidas económicas y pone en riesgo la salud pública. Los principales microorganismos involucrados son estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Staphylococcus aureus* y estreptococos. Marbofloxacin (MFX) es una fluoroquinolona de uso veterinario. Apenas existen estudios que promuevan su uso racional y prudente en caprinos en lactación. El presente estudio pretende analizar la relación farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) de MFX administrada a dosis única en cabras sanas, proponer un esquema posológico multidosis en cabras con mastitis subclínica, y comprobar su eficacia terapéutica.

Inicialmente, se realizó un estudio farmacocinético en suero y leche, tras administrar una dosis de MFX (5 mg/kg) por vía intravenosa (IV) e intramuscular (IM), en cabras lactantes sanas. Paralelamente se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para MFX frente a cepas de estafilococos (ECN n=106 y *S. aureus* n=8), aisladas de cabras con mastitis subclínicas, procedentes de establecimientos productivos de la provincia de Córdoba, Argentina. Los parámetros farmacocinéticos y los resultados CIM fueron integrados y, considerándose los puntos de corte $C_{max}/CIM_{90} > 8$ y $AUC(0-24)/CIM_{90} > 60$ para Gram positivos, se calculó la dosis diaria de MFX para un esquema de dosis múltiple vía IM, en cabras con mastitis subclínica. Para ello se seleccionaron siete individuos con diagnóstico de infección en uno de sus medios mamarios por ECN y con el contralateral sano (control). La pauta IM de MFX fue 10 mg*kg⁻¹/24h/5d. Se tomaron muestras de suero y leche durante seis días desde el inicio del ensayo para analizar los perfiles de concentración-tiempo de MFX en cada fluido. Durante el mismo período de muestreo y paralelamente, se realizaron cultivos de leche para evaluar la eficacia bacteriológica. Se midió la producción y pH lácteo de cada medio mamario. La cuantificación de MFX en suero y leche se realizó mediante cromatografía (HPLC) para el estudio de dosis única y mediante técnica microbiológica

de difusión en agar, para las dosis múltiples. El cálculo CIM se realizó mediante técnica de dilución en agar.

El estudio farmacocinético de dosis únicas (5 mg/kg) vía IV e IM, refleja una absorción rápida y completa tras su administración IM, biodisponibilidad $103 \pm 11\%$, $C_{max} = 4,19 \pm 0,81 \mu\text{g/ml}$ y $T_{max} = 0,75 \pm 0,16 \text{ h}$; una buena distribución en el organismo ($V_d = 1,42 \pm 0,45 \text{ L/kg}$ y $V_{ss} = 1,05 \pm 0,24 \text{ L/kg}$) y una mayor permanencia ($t_{1/2\lambda} = 3,82 \pm 0,99 \text{ h}$ y $4,25 \pm 0,93 \text{ h}$ y $MRT = 4,14 \pm 1,15 \text{ h}$ y $4,72 \pm 1,17 \text{ h}$ para las vías IV e IM, respectivamente) con respecto a otras fluoroquinolonas estudiadas en cabras lactantes. Marbofloxacin mostró una buena biodisponibilidad láctea, reflejada en el índice $AUC(0-t)$ leche/suero de $0,93 \pm 0,08$ (IV) y $0,89 \pm 0,19$ (IM). La C_{max} se alcanzó a las $2,00 \pm 0,00 \text{ h}$ (IV) y $2,33 \pm 0,82 \text{ h}$ (IM). A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas (d.e.s) ($p < 0,05$) entre los parámetros farmacocinéticos de las vías IV e IM en suero, en leche la $t_{1/2\lambda}$ vía IM fue menor. Marbofloxacin mostró una ligera tendencia a acumularse en la leche, reflejada por los índices $t_{1/2\lambda}$ leche/suero ($1,62 \pm 0,40$ y $1,16 \pm 0,48$) y MRT leche/suero ($1,58 \pm 0,29$ y $1,22 \pm 0,34$) para las vías IV e IM, respectivamente.

Las cepas de ECN presentaron valores CIM50 entre $0,20-0,40 \mu\text{g/ml}$, mientras que la CIM90 y CIM99 fue de $0,40-0,80 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. *Staphylococcus aureus* presentó una CIM50 de $0,20 \mu\text{g/ml}$ y una CIM90 de $0,40 \mu\text{g/ml}$.

Los resultados del estudio farmacocinético a dosis múltiple, por vía IM, mostraron un comportamiento similar al observado con dosis única. La C_{max} observada en los días 1º, 3º y 5º del tratamiento fue $9,85 \pm 4,18$, $8,45 \pm 2,90$ y $7,46 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$, en T_{max} $0,58 \pm 0,17$, $0,58 \pm 0,44$ y $0,60 \pm 0,20 \text{ h}$. La C_{max} observada tras una dosis de 10 mg/kg fue aproximadamente el doble que la descrita tras la administración de 5 mg/kg . La $t_{1/2\lambda}$ en los días 1º, 3º y 5º fue $5,43 \pm 0,77$, $7,22 \pm 1,75$ y $6,90 \pm 1,01 \text{ h}$, y el MRT fue $5,60 \pm 1,04$, $6,59 \pm 1,85$ y $6,58 \pm 0,95 \text{ h}$. La $t_{1/2\lambda}$ resultó ser menor el primer día de tratamiento, pero $AUC(0-t)$ y AUC_{∞} fue superior a la observada el resto de los días. La menor producción láctea del día 1º determinó un menor pasaje de MFX de sangre a leche. Mayor cantidad de MFX permanece en sangre y queda disponible para ser eliminada, por lo que la $t_{1/2\lambda}$ es menor que el resto de los días, en los que al incrementarse la producción, la distribución de MFX es mayor. En el estudio multidoses MFX mostró una

buena biodisponibilidad láctea, con índices $AUC(0-t)_{\text{leche/suero}}$ cercanos a la unidad. Los índices $t_{1/2\lambda_{\text{leche/suero}}}$ y $MRT_{\text{leche/suero}} > 1$ durante todos los días de tratamiento, sugieren acumulación de MFX en leche de cabra.

Al inicio del estudio, los medios mamarios sanos presentaron mayor producción y menor pH lácteo que los infectados. Durante el tratamiento con MFX la producción láctea aumentó y el pH disminuyó a valores normales (6,50-6,70). Coincidiendo con AUC menores en suero y leche, y mayor $t_{1/2\lambda_e}$ en suero. No se detectaron d.e.s. ($p < 0,05$) en los parámetros farmacocinéticos en leche entre los medios mamarios sanos e infectados. Todos los animales finalizaron el estudio con cultivos negativos en ambos medios mamarios. Los valores de C_{max}/CIM_{90} del estudio multidosis fueron $24,63 \pm 10,46$, $21,13 \pm 7,26$ y $18,64 \pm 3,06$ en los días 1º, 3º y 5º, respectivamente, y los valores de $AUC(0-t)/CIM_{90}$ fueron $108,65 \pm 20,80$, $87,15 \pm 29,71$ y $78,61 \pm 10,80$, respectivamente para dichos días. A las dosis ensayadas, de 10 mg/kg/24 h/5 días por vía IM, los indicadores de prevención de selección de mutantes AUC/MPC serían válidos para las cepas más sensibles con valores de MPC_{90} de 1,00 y 0,50 µg/ml. En conclusión, el régimen posológico de MFX evaluado (10 mg*kg⁻¹/24h/5d) mostró cumplir con los criterios de eficacia PK/PD y presentó eficacia bacteriológica en todos los animales estudiados. MFX podría ser una opción terapéutica eficaz para el tratamiento de mastitis caprinas producidas por ECN y *Staphylococcus aureus*. Es necesario practicar un uso racional y prudente de Marbofloxacin en esta especie.

SUMMARY

The demand for goat milk has increased in recent decades, leading to an intensification of production, coupled with the poor health training of producers, favors the increase of infectious diseases. Bacterial mastitis, often subclinical, is a serious problem that affects not only production but also the quality and safety of milk, generating economic losses and threatens public health. The main microorganisms involved are coagulase-negative staphylococci (ECN), *Staphylococcus aureus* and streptococci. Marbofloxacin (MFX) is a fluoroquinolone for veterinary use. There are few studies that promote rational and prudent use in lactating goats. This study aims to conduct a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis (PK/PD) of a single dose of MFX in healthy goats, propose a multi-dosage schedule in goats with subclinical mastitis, and check their therapeutic efficacy.

Initially, a pharmacokinetic study was conducted in serum and milk after administering a dose of MFX (5 mg/kg) intravenously (IV) and intramuscular (IM) in healthy lactating goats. Parallel (MIC) minimum inhibitory concentration was determined for MFX against strains of staphylococci (CNS $n = 106$ and $n = 8$ *S. aureus*) isolated from goats with subclinical mastitis from production facilities in the province of Cordoba, Argentina. The pharmacokinetic parameters and CIM results were integrated and, considering the cutoff points $C_{max}/MIC_{90} > 8$ and $AUC(0-24)/MIC_{90} > 60$ for Gram positive, the daily dose of an intramuscular multiple dose scheme of MFX with subclinical mastitis in goats was calculated. Seven individuals diagnosed with infection by ECN in one mammary medium and the healthy contralateral (control) were selected. The MFX IM regimen was $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}/24/5\text{d}$. Serum and milk samples were taken for six days from the start of the trial to analyze the concentration-time profiles of MFX in each fluid. During the same period of sampling and parallel, milk cultures were performed to assess the bacteriological efficacy. Milk production and pH of each mammary medium was measured. Quantification of MFX in serum and milk was performed by chromatography (HPLC) for the single dose study and by microbiological agar diffusion technique, for multiple dose study. The calculation of CIM was performed using agar dilution technique.

Pharmacokinetic studies of single doses (5 mg/kg) IV and IM reflects a rapid and complete absorption after IM administration, with $103 \pm 11\%$ bioavailability, $C_{max} = 4,19 \pm 0,81 \mu\text{g/ml}$ and $T_{max} = 0,75 \pm 0,16 \text{ h}$; a good distribution in the body ($V_d = 1,42 \pm 0,45 \text{ L/kg}$ and $V_{ss} = 1,05 \pm 0,24 \text{ L/kg}$) and greater permanence ($t_{1/2\lambda e} = 3,82 \pm 0,99 \text{ h}$ and $4,25 \pm 0,93 \text{ h}$ and $MRT = 4,14 \pm 1,15 \text{ h}$ and $4,72 \pm 1,17 \text{ h}$ for IV and IM routes, respectively) compared to other fluoroquinolones studied in lactating goats. Marbofloxacin showed good milk bioavailability, reflected in the index $AUC(0-t)_{\text{milk/serum}}$ of $0,93 \pm 0,08$ (IV) and $0,89 \pm 0,19$ (IM). C_{max} was reached at $2,00 \pm 0,00 \text{ h}$ (IV) and $2,33 \pm 0,82 \text{ h}$ (IM). Although no significant differences ($p < 0,05$) between the pharmacokinetic parameters of IV and IM routes were observed in serum, $t_{1/2\lambda e}$ in milk via IM route was lower. Marbofloxacin showed a slight tendency to accumulate in the milk, reflected by the indices $t_{1/2\lambda e_{\text{milk/serum}}}$ ($1,62 \pm 0,40$ and $1,16 \pm 0,48$) and $MRT_{\text{milk/serum}}$ ($1,58 \pm 0,29$ and $1,22 \pm 0,34$) for IM and IV routes, respectively.

ECN strains showed MIC_{50} values between $0,20$ and $0,40 \mu\text{g/ml}$, whereas the MIC_{90} and CIM_{99} was $0,40$ and $0,80 \mu\text{g/ml}$, respectively. *Staphylococcus aureus* presented a MIC_{50} of $0,20 \mu\text{g/ml}$ and MIC_{90} $0,40 \mu\text{g/ml}$.

The results of the multiple-dose pharmacokinetic study, intramuscularly, showed a similar behavior observed with single dose. C_{max} observed on days 1, 3 and 5 of treatment was $9,85 \pm 4,18$, $8,45 \pm 2,90$ and $7,46 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$, T_{max} was $0,58 \pm 0,17$, $0,58 \pm 0,44$ and $0,60 \pm 0,20 \text{ h}$. C_{max} observed after a dose of 10 mg/kg was approximately twice as described following administration of 5 mg/kg . The $t_{1/2\lambda e}$ on days 1, 3 and 5 was $5,43 \pm 0,77$, $7,22 \pm 1,75$ and $6,90 \pm 1,01 \text{ h}$, and the MRT was $5,60 \pm 1,04$, $6,59 \pm 1,85$ and $6,58 \pm 0,95 \text{ h}$. The $t_{1/2\lambda e}$ found to be lower on the first day of treatment, while the $AUC(0-t)$ and AUC_{∞} was higher than that observed the others days. The lower milk production determined a lower passage of MFX from blood to milk in day 1, and MFX remained in the central compartment available to be removed, and $t_{1/2\lambda e}$ was lower than in the days 3 and 5, wherein by increasing production, the distribution of MFX was greater. The study showed a good MFX bioavailability, with indexes $AUC(0-t)_{\text{milk/serum}}$ close to unity. The indices $t_{1/2\lambda e_{\text{milk/serum}}}$ $MRT_{\text{milk/serum}}$ was > 1 in all days of treatment, suggesting accumulation of MFX in goat milk.

At baseline, healthy mammary mediums have higher production and lower pH than infected ones. During treatment with MFX milk production was increased and pH decreased to normal values (6,50 to 6,70). These findings were consistent with lower AUC in serum and milk, and greater $t_{1/2\lambda e}$ in serum. No statistically significant differences ($p < 0,05$) in pharmacokinetic parameters in milk between healthy and infected mammary glands were detected. All animals completed the study with negative cultures in both mammary mediums. C_{max}/MIC_{90} of the multidose study were $24,63 \pm 10,46$, $21,13 \pm 7,26$ and $18,64 \pm 3,06$ on days 1, 3 and 5, respectively, and $AUC(0-t)/MIC_{90}$ were $108,65 \pm 20,80$, $87,15 \pm 29,71$ and $78,61 \pm 10,80$ respectively for these days. At the doses of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}/24 \text{ hr}/5$ days intramuscularly, preventive mutant selection indicators AUC/MPC_{90} would be valid for most sensitive strains with MPC_{90} values of 1,00 and 0,50 mg/ml. In conclusion, the MFX dosing regimen ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}/24/5 \text{ d}$) evaluated showed meet the PK/PD breakpoints of antimicrobial effectiveness and presented bacteriological cure in all animals studied. Therefore, MFX could be an effective therapeutic option for the treatment of mastitis goat produced by ECN and *Staphylococcus aureus*. It is necessary to make a rational and prudent use of Marbofloxacin in this species.

ÍNDICE

1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1.	PRODUCCIÓN CAPRINA	1
1.2.	MASTITIS CAPRINA	3
1.2.1.	AGENTES ETIOLÓGICOS DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS CAPRINAS.....	5
1.2.2.	BASES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS EN CABRAS	10
1.3.	FARMACOCINÉTICA DE ANTIMICROBIANOS: DISTRIBUCIÓN HACIA LA GLÁNDULA MAMARIA.	13
1.4.	MARBOFLOXACINA	20
1.4.1.	MECANISMO DE ACCIÓN	21
1.4.2.	MECANISMOS DE RESISTENCIA	24
1.4.3.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	30
1.4.4.	FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA.....	36
1.4.5.	TOXICIDAD Y CONTRAINDICACIONES DE LA MARBOFLOXACINA	42
1.4.5.4.	ARTROPATÍAS	43
1.5.	MODELOS FARMACOCINÉTICOS/FARMACODINÁMICOS Y PARÁMETROS DE EFICACIA PARA FLUOROQUINOLONAS	46
1.6.	IMPACTO DEL MODELO ANIMAL UTILIZADO SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE ANTIMICROBIANOS EN GLÁNDULA MAMARIA	55
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	63
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	67
3.1.	MATERIAL.....	67
3.1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO EN LOS ENSAYOS DE DOSIS ÚNICA Y DOSIS MÚLTIPLE	67
3.1.2.	MATERIAL FUNGIBLE.....	67
3.1.3.	FÁRMACOS Y REACTIVOS.....	69
3.1.4.	EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN	70
3.2.	MÉTODOS	71
3.2.1.	SELECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	71
3.2.2.	ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y TOMA DE MUESTRAS	73
3.2.3.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MARBOFLOXACINA, EN SUERO Y LECHE.....	78

3.2.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA	85
3.2.5.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE DATOS	87
3.2.6.	DETERMINACIÓN DE LOS INDICADORES DE EFICACIA ANTIMICROBIANA PK/PD TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR A DOSIS ÚNICA Y CÁLCULO DE LA DOSIS MÚLTIPLE	90
3.2.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
4.	RESULTADOS	95
4.1.	MÉTODO DE SELECCIÓN DE ANIMALES	95
4.2.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MARBOFLOXACINA EN SUERO Y LECHE.....	96
4.2.1.	MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/uv)	96
4.2.2.	MÉTODO MICROBIOLÓGICO	102
4.3.	CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA	105
4.4.	MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA EN ANIMALES SANOS	108
4.4.1.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO	108
4.4.2.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE	109
4.4.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE	110
4.4.4.	CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE EFICACIA Y SIMULACIÓN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR	113
4.5.	MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE EN ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA	116
4.5.1.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO	116
4.5.2.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE.....	117
4.5.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE	118
4.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL pH LÁCTEO, LA PRODUCCIÓN LÁCTEA Y SU IMPACTO SOBRE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE	123
4.7.	CÁLCULO DE ÍNDICES DE EFICACIA DE LA DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR.....	126
5.	DISCUSIÓN	135
5.1.	MATERIAL	135
5.1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	135
5.1.2.	FÁRMACOS, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN.....	135
5.2.	DISCUSIÓN DEL MÉTODO	136

5.2.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS ESTUDIOS DE DOSIS ÚNICA Y DOSIS MÚLTIPLE	136
5.2.2.	METODOLOGÍA ANALÍTICA. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICA Y MICROBIOLÓGICA	138
5.3.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA	139
5.4.	MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA EN ANIMALES SANOS	140
5.4.1.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO	140
5.4.2.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE	150
5.5.	CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE EFICACIA Y SIMULACIÓN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR	158
5.6.	MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE EN ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA	160
5.6.1.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO	160
5.6.2.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE	163
5.6.3.	EVOLUCIÓN DEL pH LÁCTEO Y LA PRODUCCIÓN LÁCTEA	166
5.6.4.	CÁLCULO DE ÍNDICES DE EFICACIA DEL RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR	167
6.	CONCLUSIONES.....	175
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	179
8.	ANEXO.....	201

I. Revisión bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. PRODUCCIÓN CAPRINA

Las cabras son un grupo de mamíferos artiodáctilos pertenecientes al género *Capra* sp, de la familia *Bovidae*. La cabra o también denominada chiva (*Capra hircus*) es una especie rumiante doméstica de importancia en la producción de alimentos (leche y carne) y fibra (lana/piel) a nivel mundial, junto al ganado ovino y bovino. Las cabras fueron domesticadas hace aproximadamente 10.000 años, y tienen una distribución cosmopolita (Ensminger y Parker, 1986). Debido a su adaptabilidad en sistemas ecológicos frágiles de zonas áridas o semiáridas con bajo contenido de materia orgánica y nutrientes, suelos muy sueltos y salinos en muchas ocasiones, con alta radiación solar, un balance hídrico negativo y precipitaciones escasas estacionadas en el verano (Arias y Alonso, 2002), las cabras son una especie adaptada perfectamente a condiciones medioambientales adversas. Gracias a sus hábitos alimenticios de “ramoneo”, permiten conservar la escasa pastura disponible, por lo que el impacto medioambiental de la producción de esta especie es mucho menor al originado por otras especies de rumiantes como los ovinos y bovinos. Estas características hacen que la especie caprina sea una excelente elección para la producción de alimentos en zonas desfavorecidas, que generalmente presentan también altos índices de pobreza, pudiendo ser una buena alternativa para promover el desarrollo económico sustentable de estas regiones.

A nivel mundial, la producción de leche se ha incrementado en los últimos veinte años, principalmente en los países en vías de desarrollo. En este periodo, el sur de Asia, Latinoamérica y el Caribe, son las regiones de mayor producción de leche a nivel mundial; siendo los bovinos la principal especie productora (85,40%), seguida de los búfalos (11,10%), caprinos (2,10%) y ovinos (1,40%). En Latinoamérica, la producción de leche de búfala y oveja es insignificante, por lo que el 99,20% corresponde a leche bovina, mientras que la leche de cabra ocupa el segundo lugar con un 0,8% de la producción (FAOSTAT, 2012a).

La producción caprina mundial también ha experimentado un crecimiento significativo en estos últimos años. Hasta el 2013, las existencias de ganado caprino en Latinoamérica ascendieron a 20.856.331 cabezas, mientras que en Argentina se

estimaron 4.375.000. Durante el año 2003 se reportaron 21.082.357 en Latinoamérica y 4.200.000 cabezas en la República Argentina (FAOSTAT, 2012b).

La producción caprina en Argentina experimenta una realidad similar a otras zonas del mundo. Las principales áreas de producción caprina del país son las ubicadas en el noroeste, centro y este, las cuales son zonas áridas o semiáridas, donde la explotación de otras especies como ovinos o bovinos es difícil. En Argentina, existen dos tipos de unidades productivas básicas o explotaciones agropecuarias (EAPs), las denominadas “tradicionales”, estrechamente asociadas a la economía doméstica, y las “modernas” que implican la cría intensiva de ganado caprino (Matta *et al.*, 2007). Las EAPs tradicionales se caracterizan por ser explotaciones familiares de tipo extensivo de hatos caprinos pequeños destinados principalmente a la producción de carne, donde la alimentación se basa principalmente en el consumo de forraje natural a campo abierto. Estos establecimientos frecuentemente carecen de tecnologías para el manejo de forrajes, suplementación, sanidad, provisión de agua e incluso electrificación rural. Por su parte, las EAPs modernas son explotaciones caprinas intensivas, con cría de cabras y cabritos a corral, incorporación de razas más apropiadas, con aplicación de tecnologías de suplementación alimentaria, manejo sanitario y reproductivo del rodeo, lo que trae aparejado una mayor productividad y rentabilidad. El principal producto de la explotación caprina es la carne, seguido de la leche y la piel.

En el año 2006 se sanciona con fuerza la ley 26.141 “Régimen para la recuperación, fomento y desarrollo de la actividad caprina” (promulgada de hecho el 18/09/2006), la cual promueve “la formación y recomposición de la hacienda caprina, la mejora de la productividad, la mejora de la calidad de la producción, la utilización de prácticas y tecnologías adecuadas, revalorización de los recursos genéticos locales, el fomento a los emprendimientos asociativos, el control sanitario, el mejoramiento genético, el control racional de la fauna silvestre, el apoyo a sistemas productivos y las acciones comerciales e industriales realizadas preferentemente por el productor, cooperativas y/u otras empresas de integración horizontal y vertical que conforman la cadena industrial y agroalimentaria caprina.” La propuesta representa una alternativa de diversificación que permite incrementar los ingresos de las EAPs con una mínima inversión inicial (MAGyP, 2006).

En la provincia de Córdoba, Argentina, la ley de promoción de la producción caprina ha permitido incrementar el número de explotaciones caprinas modernas, las cuales incorporan tecnología, manejo nutricional, reproductivo y sanitario, lo que permite mejorar los índices productivos y permite la apertura a nuevos mercados, mediante la comercialización local y exportación principalmente de leche.

La sanidad de los hatos de las EAPs está vinculada a las características productivas descriptas previamente. En el sistema tradicional, y debido a la falta de atención veterinaria, los animales son asistidos por sus propietarios conllevando a fracasos terapéuticos. Por otra parte si bien existe mayor control sanitario en el sistema moderno, la intensificación de la producción a su vez incrementa el riesgo de presentación de enfermedades, fundamentalmente de origen parasitario e infeccioso.

Un estudio realizado por Rossanigo *et al.* (2002) durante los años 1999 al 2001 en el noroeste argentino y en más de 8000 animales, evidenció que un 15 % de las enfermedades eran de origen infeccioso. Por su parte Bedotti y Sánchez Rodríguez (2004), recopilaron los resultados de una serie de encuestas realizadas en la provincia de La Pampa (Argentina) entre 1991 y 1995 tendientes a determinar la prevalencia de algunas enfermedades en aproximadamente 7000 animales. Entre las enfermedades infecciosas la más común fue el ectima contagioso (parapoxvirus), que afecta a un alto porcentaje de los cabritos; siendo reconocido como un problema importante por el 81 % de los productores. Le siguieron en importancia las diarreas de los cabritos (67%), producidas principalmente por *Escherichia coli*, y las mastitis (60%).

1.2. MASTITIS CAPRINA

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria. En el ganado caprino, al igual que en el resto de las especies rumiantes lecheras, la mastitis ha sido y continúa siendo la patología más frecuente en este tipo de explotaciones, repercutiendo no sólo en el bienestar de los animales sino también a nivel económico, tanto por las pérdidas en la producción, como en la calidad de la leche. La calidad está referida a los aspectos higiénicos sanitarios como a la composición bioquímica de la leche (grasas, proteínas y extracto seco).

En la tabla Tabla 1 se puede apreciar cómo la mastitis afecta negativamente a la composición bioquímica de la leche, alterando consecuentemente a la elaboración de los quesos, principal producto derivado de la leche de cabra. Por otra parte, la disminución en la ganancia de peso del cabrito lactante afecta al sector productivo y a la comercialización cárnica. Finalmente, la comercialización o consumo familiar de productos de baja calidad, conlleva el riesgo añadido de zoo-antropozoonosis, por la potencial ingestión de enterotoxinas termorresistentes procedentes de estafilococos lácticos (Corrales *et al.*, 1997; Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007).

Tabla 1: Efecto de la infección intramamaria sobre la producción y las características bioquímicas de la leche caprina.

Parámetro	Estatus bacteriológico		Significancia
	No infectada	Infectada	
Leche (Kg/ordeño)	0,98 ± 0,04	0,69 ± 0,04	p < 0,0001
RCS (x10 ³)	417 ± 72	1750 ± 197	p < 0,0001
Grasa (g/L)	38,90 ± 1,10	38,80 ± 1,20	NS
Proteína (g/L)	34,20 ± 0,50	35,00 ± 0,50	p = 0,0700
Lactosa (g/L)	47,00 ± 1,00	41,70 ± 1,30	p = 0,0040
Suero (g/L)	6,10 ± 0,30	6,80 ± 0,40	p < 0,0001
Caseína (mg/ml)	28,10 ± 0,70	28,20 ± 0,80	NS
Albúmina (µg/ml)	279,90 ± 22,20	471,80 ± 49,80	p = 0,0030

RCS: recuento de células somáticas; NS: no significativo. Corrales *et al.* (1997).

En la mayoría de los casos, la mastitis es causada por agentes infecciosos. En un primer momento se produce el ingreso de microorganismos a través del canal del pezón hacia la glándula mamaria, debido a anomalías anatómicas del canal, lesiones en el mismo, o el reflujo generado por mal funcionamiento del equipo de ordeño. La multiplicación activa de los microorganismos genera una reacción inflamatoria caracterizada por la liberación de mediadores químicos, migración de neutrófilos y macrófagos. El proceso inflamatorio generado es el principal responsable de los signos clínicos, la caída en la producción láctea y las alteraciones en las características físico químicas observadas en la leche (Smith y Sherman, 2009; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

La mastitis puede manifestarse en las formas clínica o subclínica. Esta última se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio leve, por lo cual, es clínicamente inaparente. La importancia de esta presentación radica en la disminución de la calidad de la leche y la tendencia a generar infecciones persistentes de elevada frecuencia en el período de lactación. Debido a que es una patología subclínica, frecuentemente se encuentra sub-diagnosticada en los establecimientos que no realizan de forma rutinaria controles sanitarios en el hato. La incidencia en cabras puede ser alta, superando la mayoría de los casos al 30% de los animales en período de lactancia, y la única manera de diagnosticarla es mediante la realización de controles sanitarios en la leche a través del recuento de células somáticas y el cultivo microbiológico (Bergonier *et al.*, 2003; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Las mastitis clínicas cursan con alteraciones inflamatorias importantes en la glándula (destrucción masiva de tejido, gangrena o fibrosis), presentándose en algunos casos signos sistémicos tales como fiebre y, en el caso de infecciones por Gram-negativos, endotoxemia (Smith y Sherman, 2009; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012). La incidencia en cabras es en general baja (inferior al 5%, por año), salvo en casos de brotes epidémicos en los que puede ascender al 30 – 50%, con tasas de mortalidad que alcanzan hasta el 70% de los animales. En hatos con baja incidencia, del 1,5 al 30% de los casos cronifican durante meses y aproximadamente un 20% de los animales infectados son descartados, mueren o son sacrificados (principalmente entre los 2 a 3 primeros meses de lactación) (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007).

Es esencial un mayor y mejor conocimiento de los agentes etiológicos, factores de riesgo, tratamientos y medidas de control, para tomar medidas terapéuticas y de manejo para garantizar la calidad e inocuidad de la leche, y mejorar el desempeño productivo del hato.

1.2.1. AGENTES ETIOLÓGICOS DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS CAPRINAS

Los agentes etiológicos productores de mastitis en cabras son numerosos, y pueden ser clasificados como patógenos mamarios o como patógenos contagiosos. Los patógenos mamarios son aquellos que residen en el canal del pezón o la piel circundante, y producen mastitis principalmente por contagio de una glándula infectada

a otra sana mediante el ordeño. Por otra parte, los patógenos contagiosos o ambientales tienen su hábitat en el ambiente, y residen principalmente en la cama de paja, agua o suelo contaminado con estiércol. A continuación se desarrollan los principales agentes etiológicos de la mastitis caprina subclínica y clínica (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

1.2.1.1. AGENTES PRODUCTORES DE MASTITIS SUBCLÍNICAS

Los estafilococos coagulasa negativos (ECN), si bien son considerados como oportunistas, son los que se aíslan con mayor frecuencia (71%) en mastitis; (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007). Entre los ECN más frecuentes se hallan *S. caprae* (10,8 – 47,7%), *S. xylosus* (11,1 – 23,8%), *S. chromogenes* (23%), *S. epidermidis* (8,8%), *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, entre otros (Contreras *et al.*, 2007; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012). Los ECN son habitantes normales de la piel y el canal del pezón, y se transmiten por el ordeño. En general los brotes de mastitis por ECN se deben a deficiencias en el manejo sanitario del establecimiento, tales como inadecuada higiene y limpieza de los pezones y la máquina de ordeño (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

El género *Enterococcus* es otro importante microorganismo causante de mastitis subclínica y sus especies más representativas en la patología mamaria son *E. faecalis*, *E. faecium* y *Aerococcus viridans* (Corrales *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

Los estreptococos son patógenos secundarios, poseen una baja prevalencia (5 – 10%), y generalmente producen mastitis clínicas, aunque junto al género *Enterococcus* son los segundos agentes productores de mastitis subclínicas en el ganado caprino. Entre los estreptococos ambientales *St. bovis*, *St. dysgalactiae*, *St. pyogenes* y *St. uberis* son los que se aíslan con mayor frecuencia (Contreras *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus aparece con menor frecuencia que los ECN en las mastitis subclínicas (5 – 8%), pero es el principal productor de la forma clínica. Es un microorganismo perteneciente a la flora normal de la mayoría de los animales, y vive en el canal y la piel del pezón y se transmite mediante el ordeño. Puede también sobrevivir en el ambiente, ya sea en la máquina ordeñadora, instrumentos utilizados durante el ordeño o paños para secar o limpiar las ubres (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Los representantes del género *Mycoplasma*, en general producen mastitis subclínicas y son los responsables del síndrome de agalaxia contagiosa caprina, enfermedad que produce grandes pérdidas económicas en todo el mundo debido a la diseminación de micoplasmas a todo el organismo, produciendo artritis, postración, conjuntivitis y otros trastornos respiratorios y reproductivos. Los más importantes son *M. agalactiae*, *M. mycoides* subespecie *mycoides* LC, *M. capricolum* subespecie *capricolum*, *M. agalactiae* y *M. putrefaciens* (Corrales *et al.*, 2004).

1.2.1.2. AGENTES PRODUCTORES DE MASTITIS CLÍNICAS

Staphylococcus aureus es el principal productor de la forma clínica, la cual se caracteriza por recuentos celulares altos. Las cepas toxigénicas de *S. aureus* producen un tipo de mastitis gangrenosa similar a la producida por *Clostridium perfringens* que, en muchos casos, puede estar en asociación con el mismo y que generalmente conlleva a la pérdida de la glándula mamaria infectada e incluso puede poner en riesgo la vida del animal (Contreras *et al.*, 2007). La mastitis gangrenosa se caracteriza por una secreción de color rojo oscuro que frecuentemente se acompaña de burbujas de gas y flóculos. Normalmente la glándula afectada se encuentra edematosa, dolorosa, con manchas moradas o negras. Los animales pueden presentar fiebre intensa, seguida de sepsis y muerte, si no se instaura un tratamiento adecuado. Las infecciones por *S. aureus* suelen producir cápsulas de tejido conectivo, que en muchos casos puede limitar la llegada de los ATM al sitio de infección. Estas cápsulas pueden romperse diseminando el agente a otras zonas de la glándula mamaria (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Los estreptococos son patógenos secundarios, poseen una baja prevalencia (5 – 10%), y generalmente producen mastitis clínicas. Entre otras especies importantes que producen la infección intramamaria pueden citarse *St. Acidominimus*, *St. zooepidemicus* y *St. grupo C*, productor de pseudoagalaxia caprina, una patología similar a la agalaxia caprina producida por el género *Mycoplasma* sp. Entre los estreptococos ambientales, los que se aíslan con mayor frecuencia son *St. bovis*, *St. agalactiae*; *St. dysgalactiae*, *St. pyogenes* y *St. Uberis*. Generalmente se encuentran en la cama, el agua o suelos contaminados con materia fecal, y suelen observarse brotes en establecimientos con mala higiene de las instalaciones (Contreras *et al.*, 2007; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Las enterobacterias, están implicadas con mayor frecuencia en casos esporádicos de mastitis clínica, en los que presentan una prevalencia similar a los estreptococos. Dentro de este grupo se encuentran los coliformes (*Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. y *Klebsiella* sp.). Entre los microorganismos no fermentadores de lactosa productores de mastitis caprina se hallan *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* sp. y otros géneros de menor importancia (Corrales *et al.*, 1997; Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007). Las causas más comunes de infección son las deficiencias en las condiciones higiénico-sanitarias de las instalaciones; los animales más afectados son los inmunodeprimidos (como por ejemplo las cabras al inicio de la lactancia, tras sufrir el estrés propio del parto). Las enterobacterias (principalmente la *E. coli*) liberan grandes cantidades de enterotoxinas al ser destruidas, lo que induce una gran inflamación, con frecuencia de tipo gangrenoso, que puede cursar con fiebre alta e incluso evolucionar a sepsis y muerte del animal (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Los representantes del género *Pseudomonas* producen mastitis clínicas graves que puede ser incluso de tipo gangrenoso, similar a la producida por *E. coli*. Muchas de ellas de difícil solución, dado que son microorganismos que generan rápidamente resistencia a la mayoría de los ATMs utilizados para el tratamiento de la mastitis y/o la terapia preventiva durante la fase de secado. Es por ello que producen con relativa frecuencia infecciones persistentes. Muestran una gran capacidad para sobrevivir en el suelo, principalmente en el agua, y sobre diferentes superficies por ejemplo la maquinaria de ordeño. En general son resistentes a diversos desinfectantes. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las especies encontradas con mayor frecuencia (Contreras *et al.*, 2007; Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

Los géneros *Mannheimia* y *Pasteurella* son potenciales productores de mastitis clínicas. Estos microorganismos residen normalmente en el tracto orofaríngeo y la principal vía de transmisión es a través del amamantamiento del cabrito. Las mastitis clínicas producidas por estos géneros son raras en aquellos países en los que se implementa la crianza artificial. El periodo de amamantamiento de los cabritos dura un mes, a diferencia de otras especies de rumiantes en las que el tiempo de exposición es mayor. Las especies de mayor importancia son *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007).

Aunque la prevalencia de *Arcanobacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes*) es baja, las mastitis clínicas de tipo gangrenoso producidas por estos microorganismos conllevan a alteraciones importantes en la producción de leche y a un gran aumento en el recuento de células somáticas (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007). La vía de transmisión más importante es la mosca del establo *Hydrotea irritans*, o bien mediante el contacto del pezón con superficies contaminadas (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012).

La prevalencia de los casos de mastitis por *Clostridium perfringens* es baja. Poduce un tipo de mastitis clínica gangrenosa, con olor intenso. En casos extremos se observa secreción láctea hemorrágica o interrupción de la secreción. El proceso suele ser de tal gravedad que puede causar la pérdida de la glándula y/o la muerte del animal por toxemia. A menudo se aísla junto a *S. aureus* (Corrales *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

Los representantes del género *Mycoplasma*, en general producen mastitis subclínicas, aunque pueden producir mastitis clínicas y son los responsables del síndrome de agalaxia contagiosa caprina, un síndrome infeccioso producido por varias especies de micoplasmas que produce grandes pérdidas productivas, económicas y tiene impacto en la salud pública. Este síndrome se caracteriza por la diseminación de micoplasmas en todo el organismo, produciendo mastitis, artritis, conjuntivitis y otros trastornos respiratorios y reproductivos (Corrales *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2007). Los más importantes son *M. agalactiae*, *M. mycoides* subespecie *mycoides* LC, *M. capricolum* subespecie *capricolum*, *M. agalactiae* y *M. putrefaciens* (Corrales *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2007; Gómez-Martín *et al.*, 2013). Estos microorganismos se pueden transmitir por múltiples vías, aunque la transmisión oral y mamaria son las más importantes. Las mastitis clínicas producidas por micoplasmas pueden durar semanas a meses y se caracterizan por inflamación y dolor, una disminución en la producción y un cambio de color en la leche, acompañado de flóculos que en ocasiones pueden obstruir el canal del pezón (Corrales *et al.*, 2007; Gómez-Martín *et al.*, 2013). En las zonas endémicas, muchos animales del hato pueden estar infectados y desarrollar mastitis subclínica, o en menor proporción presentar mastitis clínicas. Esta enfermedad se caracteriza por diseminarse fácilmente entre los animales, generando focos de reservorio que muestran infecciones persistentes de tipo crónico (Gómez-Martín *et al.*, 2013).

La persistencia de infecciones subclínicas durante el período de lactación en general es alta y pueden ser causadas por un único agente, o ser infecciones múltiples en las que coexisten varios agentes etiológicos. En la figura Figura 1 se resumen las frecuencias relativas de patógenos comunes productores de mastitis subclínicas (Bergonier *et al.*, 2003).

Los principales agentes etiológicos productores de mastitis clínicas son estafilococos, estreptococos u oportunistas mayoritariamente Gram-negativos, tales como enterobacterias, *Pseudomonas sp*, *Mannheimia sp*, *Pasteurella sp* y *Mycoplasma sp* (Bergonier *et al.* 2003, Contreras *et al.*, 2007).

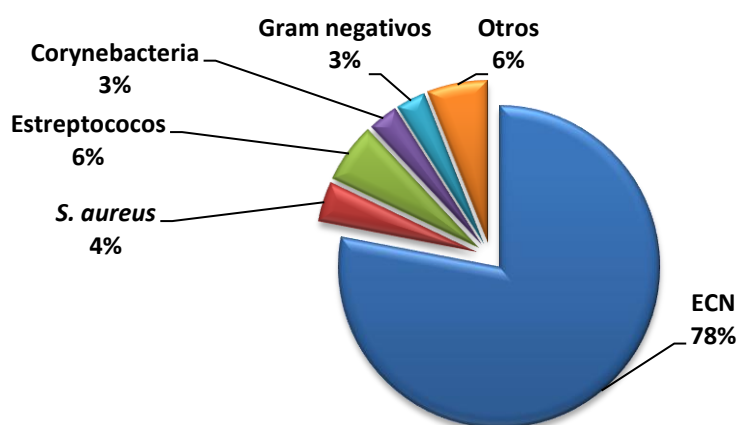


Figura 1: Incidencia de los principales patógenos productores de mastitis subclínicas en cabras.

1.2.2. BASES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS EN CABRAS

Considerando que la mastitis es una patología frecuente en los sistemas productivos lecheros, se debería contemplar el tratamiento, como parte de un programa integrado de prevención y control de la enfermedad. En este sentido se debe hacer hincapié en las medidas de higiene durante el ordeño (incluyendo la desinfección de pezones), el descarte de animales con infecciones intramamarias crónicas, la detección precoz y el uso racional y prudente de ATMs tanto en procesos clínicos como subclínicos. Lamentablemente, y debido a la escasa información existente acerca de protocolos terapéuticos con ATMs en caprinos, se ha convertido en una práctica habitual el realizar extrapolaciones posológicas por imitación, a partir de la experiencia clínica en bovinos u ovinos (Bedolla Cerdeño *et al.*, 2012). Favorecido por el hecho de que la mayoría de las especialidades medicamentosas con base antimicrobiana, están desarrolladas para el

sector vacuno, tal como ocurre con los preparados intramamarios. Si bien es cierto que en contadas ocasiones el uso fuera de prospecto puede acogerse a los principios de uso racional, también lo es que en la mayoría de los casos esto no se cumple. En muchas ocasiones deriva en una incorrecta selección del principio activo, o bien se sobredosifica o infradosifica, o no se establecen correctos intervalos de dosificación. Este uso incorrecto de los fármacos ATMs no sólo puede conllevar al fracaso terapéutico, sino que incrementa factores de riesgo tales como la presencia de residuos de estos xenobióticos en alimentos de origen animal y en el ambiente, es causa de problemas de toxicidad en el animal, y favorece la presentación de resistencia antibacteriana, una amenaza cada vez más preocupante (Boerlin y White, 2006; Scott y Menzies, 2011).

Existen numerosos factores que inciden directa o indirectamente en el éxito terapéutico ATM y que clásicamente se agrupan en una tríada conformada por la interacción entre el agente infeccioso, el fármaco ATM y las características del animal infectado y que es tratado (Davis *et al.*, 1968; figura Figura 2).

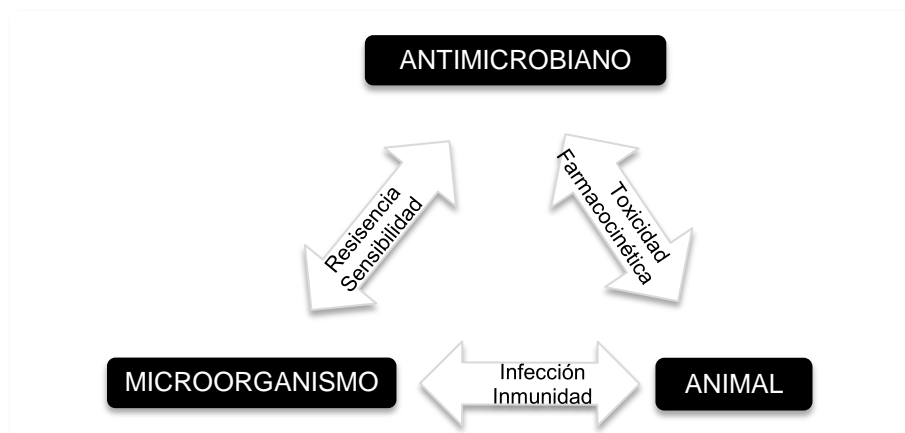


Figura 2: relación entre el ATM, microorganismo y el animal, para el éxito terapéutico.

Es importante individualizar el tratamiento (incluso si es un colectivo) y considerar no sólo la especie, sino además, factores relacionados a la raza, el sexo, la edad, los estados patológicos (como la mastitis o el grado de inmunocompromiso del individuo), particulares estados fisiológicos como la gestación, e incluso los estados productivos. En este último sentido cobra notoria importancia la producción láctea, ya que el tiempo de permanencia del ATM en el organismo varía con la misma. De esta manera se ha

observado que tras la administración sistémica de un ATM, los animales de baja producción tardan más en excretar el fármaco; Lucas *et al.* (2010) demostraron este efecto con azitromicina administrada vía IM en vacas en lactantes. Por otra parte, el ordeño frecuente aumenta el efecto de dilución, por lo que el tiempo de eliminación es menor (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007).

Si bien la sensibilidad del agente causal al ATM seleccionado es fundamental, la curación microbiológica no existiría si no se considerara la llegada del fármaco al tejido mamario (tras la administración sistémica) y su permanencia en el mismo. De este modo la elección de la vía dependerá en gran parte de las características farmacocinéticas de cada principio activo en particular (*vide infra*), así como también de la extensión de la infección (San Andrés y Boggio, 2007).

La vía sistémica se reserva para moléculas que atraviesan bien las barreras biológicas y en casos en los que la infección compromete las partes más profundas de la glándula, ya que a través de la sangre el ATM puede llegar en forma más uniforme a todo el tejido (San Andrés y De Lucas Burneo, 2007). En tanto que la vía intramamaria es de elección para realizar tratamientos en infecciones más localizadas, o como terapia durante el periodo de secado. Esta vía permite la administración de moléculas hidrosolubles que atraviesan poco las barreras celulares, permitiendo que el antibiótico se concentre en la glándula.

La tabla 2 muestra la capacidad de atravesar barreras biológicas, para algunos grupos de ATMs (Sánchez *et al.*, 1998).

Tabla 2: Elección de la vía de administración, según la capacidad de difusión del grupo ATM desde la sangre hacia la glándula mamaria.

Grupo ATM	Llegada a glándula mamaria desde la sangre	Vía de elección
Aminoglucósidos	Baja	Local
Penicilinas	Moderada	Local
Cefalosporinas	Moderada	Local
Tetraciclinas	Moderada	Local
Nitrofuranos	Alta	Local y sistémica
Sulfa + Trimetoprim	Alta	Local y sistémica
Fluoroquinolonas	Muy alta	Local y sistémica
Macrólidos	Muy alta	Local y sistémica

El curso clínico o subclínico de la infección intramamaria, también se debe considerar para instaurar un tratamiento. Los casos de mastitis subclínicas se tratan una vez finalizada la lactancia, con ATMs administrados por vía intramamaria, ya que en este período el agente ATM permanece durante mayor tiempo en la glándula (no existe fenómeno de dilución, ni de ordeño). Se suelen seleccionar fármacos con espectro dirigido fundamentalmente hacia estreptococos y estafilococos y, de preferencia, preparados de liberación retardada. Si bien el tratamiento durante el período de secado es importante en los individuos con infecciones intramamarias, actualmente es discutible su uso preventivo en animales libres de infección, debido al alto riesgo de selección de cepas bacterianas resistentes (Corrales *et al.*, 1998).

Las mastitis clínicas a menudo pueden ocasionar alteraciones permanentes en el tejido mamario e incluso la pérdida de la ubre. El tratamiento debe instaurarse de forma temprana, una vez diagnosticada y suele ser más intensivo que el tratamiento de las mastitis subclínicas, siendo su pilar la terapia antimicrobiana combinada con terapia de mantenimiento (Smith y Sherman, 2009).

1.3. FARMACOCINÉTICA DE ANTIMICROBIANOS: DISTRIBUCIÓN HACIA LA GLÁNDULA MAMARIA.

Los ATMs, al igual que otros fármacos, presentan una relación estrecha entre la concentración alcanzada en el sitio de actuación (en cuadros de mastitis el tejido mamario y la leche), el tiempo de permanencia en el mismo, y su efecto o eficacia antimicrobiana. Esta relación entre concentración y permanencia están regidas por los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución y eliminación, que a su vez son dependientes de numerosos factores, algunos dependientes del individuo medicado y otros del ATM administrado.

En el caso particular de los ATMs, la distribución desde la sangre hacia la leche (y en sentido inverso), se produce principalmente mediante un proceso de difusión pasiva que responde a la ley de Fick (Armijo, 2004). Expresado en la ecuación 1. La cual establece que la tasa de difusión de un compuesto a través de una membrana (TD) es directamente proporcional a su gradiente de concentración (ΔC), la superficie de la membrana (A), y su coeficiente de difusión (D), e inversamente proporcional al espesor

de la membrana biológica que debe atravesar (h) (Rowland y Tozer, 1995; Armijo, 2004; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009).

Ecuación 1:

$$TD = \frac{\Delta C \cdot A \cdot D}{h}$$

Para que una molécula atravesase una membrana biológica, no sólo se debe considerar la superficie (A) y espesor (h) de la misma, sino también su estructura. Algunos territorios orgánicos como el sistema nervioso central, útero, placenta, próstata, globo ocular y la glándula mamaria, presentan estructuras anatomofisiológicas que ejercen de barreras selectivas. De esta manera, la barrera hematoencefálica, prostática, los diferentes tipos de placentación en mamíferos, la barrera hematoacuosa y hematorretiniana, y la barrera hemato-láctea, poseen la función de permitir el paso de determinadas moléculas y restringir el de otras (incluidos los ATMs). Estas barreras pueden influir sobre la concentración alcanzada de un ATM, independientemente de su volumen de distribución (*vide infra*) (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007). En el caso de la barrera hemato-láctea, el ATM circulante en sangre debe atravesar las siguientes estructuras para llegar a la leche: a) la capa de células endoteliales, b) la membrana basal de los capilares, c) el intersticio, d) una capa de células mioepiteliales, e) la membrana basal alveolar mamaria, y f) el epitelio correspondiente al alveólo mamario (Armijo, 2004; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009).

El coeficiente de difusión (D) se encuentra en función de la estructura molecular del fármaco, su peso molecular, su solubilidad en la membrana, y su grado de ionización (Rowland y Tozer, 1995; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009). Las tres primeras características, permanecen constantes en los procesos farmacocinéticos, mientras que la ionización puede verse modificada de acuerdo al pH del medio biológico en el que se encuentre disuelto el fármaco.

Con respecto al peso molecular, la mayoría de los ATMs oscilan entre 500 y 650 Da, lo que los hace adecuados para difundir a través de las membranas lipídicas con facilidad (Armijo, 2004).

La liposolubilidad de un fármaco determina en gran medida su capacidad para atravesar barreras biológicas, debido a que éstas últimas se encuentran formadas por

fosfolípidos. A mayor liposolubilidad, mayor será la capacidad del ATM para penetrar en la glándula mamaria y pasar a leche. Debido al importante porcentaje de grasa que posee la leche (4,50% en el caso de la cabra, 3,90% en la vaca y 7,20% la leche ovina), las sustancias con mayor liposolubilidad tenderán a acumularse en mayor medida en la misma. De modo que dos ATMs con pKa similar y liposolubilidad diferente, presentaran relaciones de concentración leche/plasma y porcentajes de recuperación distintos (tabla 2) (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007).

Tabla 2: relación leche/plasma teórica y experimental de algunos ATMs.

Fármaco	Liposolubilidad	pKa	Leche/Plasma teórica	Leche/Plasma experimental
Cloxacilina	Alta	2,80	0,20	0,20
Novobiocina	Alta	4,30	0,30	0,30
Cefaloglicina	Alta	4,90	0,30	0,30
Penetamato	Alta	8,50	5,70	5,10
Eritromicina	Alta	8,80	6,20	3,50
Penicilina G	Moderada	2,80	0,20	0,20
Penicilina V	Moderada	2,80	0,20	0,20
Sulfacetamida	Baja	5,40	0,10	0,10

San Andrés y de Lucas Burneo, 2007.

La gran mayoría de los fármacos estudiados son ácidos o bases débiles, que en solución, se encuentran en un equilibrio entre un estado ionizado y uno no ionizado (denominado fenómeno de partición por pH). Los ácidos débiles protonados son moléculas no ionizadas (COOH), mientras que las bases débiles protonadas se encuentran en forma ionizada (NH₃⁺). Las membranas biológicas son permeables a las moléculas no ionizadas (y con coeficientes de partición lípido/agua favorables para atravesarla), y ofrecen cierta resistencia al paso de moléculas ionizadas debido a su carga eléctrica; por lo tanto la velocidad de difusión de uno a otro lado de la membrana (y el estado de equilibrio entre sangre y leche) estará en relación directa con la presencia o ausencia de carga del fármaco (Rowland y Tozer, 1995; Armijo, 2004; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009). El equilibrio entre la forma ionizada y no ionizada de un compuesto en solución depende del pKa de la molécula (definido como el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida) y el pH del medio en ambos lados de la membrana, como por ejemplo el pH de los medios extracelular e intracelular,

o el existente entre la leche y la sangre. De tal modo que, cuando el pH del medio sea igual al pKa del compuesto en cuestión, un 50% del mismo se encontrará en forma ionizada y el otro 50% en forma no ionizada. Modificándose dicha proporción cuando el pH del medio sea diferente al pKa del fármaco. Estas relaciones pueden ser explicadas mediante las ecuaciones de Henderson y Hasselbalch (ecuaciones Ecuación 2 y Ecuación 3).

Para ácidos:

$$\text{Ecuación 2:} \quad pK_a - pH = \log \left[\frac{(H \text{ ácido})^0}{(\text{ácido})^-} \right]$$

Para bases:

$$\text{Ecuación 3:} \quad pK_a - pH = \log \left[\frac{(H \text{ base})^+}{(\text{base})^0} \right]$$

Donde $(H \text{ ácido})^0$ es la forma protonada del ácido débil sin carga neta, y $(\text{ácido})^-$ es la forma no protonada ionizada. En el caso de las bases, $(H \text{ base})^+$ es la forma protonada ionizada, mientras que $(\text{base})^0$ es la forma no protonada no ionizada (Rowland y Tozer, 1995; Armijo, 2004; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009).

Como puede deducirse de estas ecuaciones, cuando el pH del medio es una unidad menor o mayor que el pKa de una base débil o ácido débil, respectivamente, la razón de moléculas ionizadas y no ionizadas es 10 (lo que significa que por cada una molécula no ionizada habrán 10 en estado ionizado). Así, por cada unidad de diferencia entre el pH y el pKa el cambio en la relación ionizado/no ionizado se ve incrementado en un factor de 10 (Riviere, 2009).

De esta manera, los fármacos pueden distribuirse en forma diferencial a uno y otro lado de una membrana, concentrándose en el compartimiento en donde la molécula se encuentre en mayor proporción en estado ionizado. Este fenómeno se denomina trampa iónica (atrapamiento en función del pH), y explica por qué algunos fármacos tienden a acumularse en algunos tejidos o secreciones orgánicas (Tabla 2).

El modelo de trampa iónica sirve para comprender el fenómeno de acumulación en leche observado con algunos ATMs. Debido a que el pH de la leche es más ácido que el

plasma, las bases débiles se encontrarán en mayor proporción en estado ionizado, por lo que les resultará más difícil atravesar las membranas biológicas de la glándula mamaria para regresar a la sangre. Los ácidos débiles, por el contrario, se encontrarán en mayor proporción en estado no ionizado en la leche, por lo que les será más fácil atravesar las membranas y regresar a la sangre. De esta manera, las bases débiles tenderán a presentar mayor concentración en leche que en el plasma (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007).

Es importante considerar que en casos de mastitis, el pH de la leche normal (6,50 - 6,70) puede incrementarse unas 0,70 unidades, hecho que modifica la distribución de los ATMs, modificándose el coeficiente de reparto leche/plasma (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007).

En el caso particular de los ATMs pertenecientes al grupo de las fluoroquinolonas, como la MFX, son moléculas anfotéricas que poseen dos grupos disociables y, por lo tanto, dos valores de pKa, con un punto isoeléctrico, que es el valor de pH en el cual se alcanza la mayor concentración de moléculas no ionizadas. Cuando el pH del medio se encuentra entre estos valores de pKa, la molécula se encuentra predominantemente en estado no ionizado. Es por ello que la mayoría de las fluoroquinolonas (que poseen valores de pKa entre 5 y 9) se encuentran principalmente en estado no ionizado para valores de pH entre 6 a 8, por lo que en el organismo permiten atravesar adecuadamente las membranas biológicas. La figura

Figura 3 ilustra este fenómeno para el caso de la MFX (con valores de pKa entre 5,69 y 8,00 y un punto isoeléctrico de 6,85), que se encuentra entre dos medios: leche con pH = 6,50 – 6,80 y el plasma con pH = 7,40 (Jiménez Lozano *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2006).

Como puede apreciarse en la

Figura 3, la forma no ionizada de la MFX se encuentra en equilibrio entre ambos compartimentos dado que la membrana es permeable a la forma no ionizada del fármaco. En la leche, la fracción ionizada de MFX será de 30,88%, mientras que en el plasma la fracción ionizada será del 21,99%. Según esto, la MFX presentará una tendencia a acumularse en leche, sin embargo, esta diferencia no sería tan grande como para resultar en un fenómeno de atrapamiento iónico significativo.

Otro aspecto a considerar, puesto que presenta una importante influencia en las características cinéticas de un fármaco, es el grado de unión del mismo a los componentes de la sangre y a diferentes elementos tisulares del organismo.

En sangre, las moléculas de un ATM pueden ser transportadas disueltas en el plasma, fijadas a proteínas plasmáticas, o unidas a la fracción globular (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). A su vez, aquellos fármacos que se fijan a la porción globular, pueden unirse a diferentes estructuras como proteínas de membrana o estructuras intracelulares como proteínas vacuolas u organelas (Armijo, 2004; Aleixandre y Puerro, 2005; Riviere, 2009).

El grado en que cada ATM se une a las proteínas plasmáticas es muy variable, pudiendo ser cercano al 50% para el caso de la penicilina G, o superior al 90% para doxiciclina, dicloxacilina o clindamicina (Armijo, 2004).

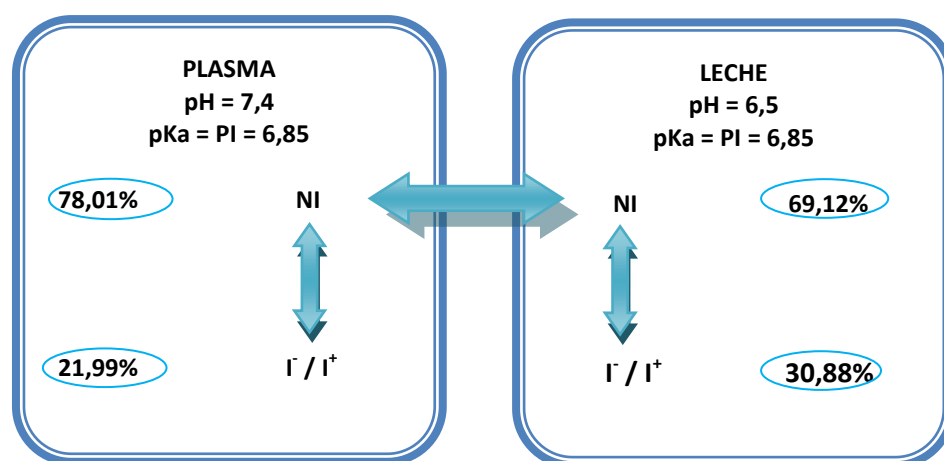


Figura 3: Fenómeno de partición dependiente del pH, y efecto de trampa iónica de MFX.

PI: punto isoelectrónico; NI: fracción no ionizada; I^- : fracción ionizada. Adaptado de Riviere (2009).

La albúmina es una proteína plasmática que posee un importante rol en el transporte de ácidos débiles en la sangre, mientras que las glicoproteínas ácidas lo hacen con las bases débiles. En la gran mayoría de los casos, la unión a proteínas plasmáticas es de tipo reversible, y se encuentra mediada por enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formados entre átomos o grupos químicos presentes en el compuesto y los correspondientes a las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas plasmáticas (Riviere, 2009). La fuerza de estas uniones depende de la proximidad entre los átomos participantes y disminuye rápidamente con la distancia entre ellos. Si bien

estos tipos de enlaces son débiles de manera aislada, la sumatoria de ellos a medida que suceden múltiples interacciones hace que la unión entre ellos dependa del ajuste espacial entre sus estructuras tridimensionales, de manera que para cada compuesto existen una constante de disociación característica (K_{dis}), que refleja la intensidad con la que el fármaco se une a las diferentes estructuras mencionadas. De esta manera, aquellos compuestos que se unen fuertemente a las mismas presentan valores bajos de K_{dis} (Riviere, 2009).

La K_{dis} determina la fracción de fármaco libre en el plasma (f_{Lp}), que es la cantidad de compuesto disponible para difundir a través de membranas biológicas, y es de suma importancia para la actividad farmacológica; a su vez, la fracción que queda unida a proteínas del plasma, constituye un sitio de depósito (Riviere, 2009). Es de destacar que se deben tener en cuenta estas interacciones para la interpretación del parámetro farmacocinético volumen de distribución (V_d), que se explica resumidamente en la figura 4 (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b; Riviere, 2009).

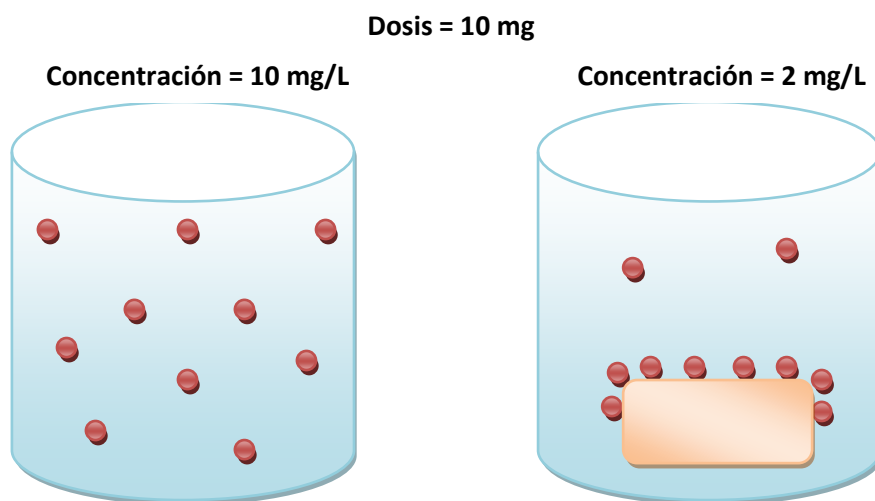


Figura 4: sistema simplificado para introducir el concepto de volumen de distribución (V_d). Matemáticamente el V_d es la relación entre la dosis del medicamento y su concentración plasmática (Dosis / concentración). En el esquema, la misma cantidad de fármaco (10 mg) se disuelve en un mismo volumen de líquido (1 L) contenida en dos recipientes. En de la izquierda, la concentración final es 10 mg/L; por lo cual su V_d será de 1 L. Por otra parte, en el recipiente de la derecha, se observa que 8 unidades del fármaco (8 mg) se une a una estructura que simula los tejidos corporales por lo que la concentración final del fármaco libre (y con capacidad de difundir) será de 2 mg/Ly por lo tanto su V_d de 5 L (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b).

Por otra parte, la misma relación (fracción libre y de depósito), también puede ocurrir fuera del lecho vascular debido a que un fármaco ATM también puede fijarse a proteínas

tisulares (en la mayoría de los casos) tanto extra como intracelulares, e incluso puede unirse a aquellas proteínas que se encuentran en determinadas secreciones, como en el caso de la caseína presente en la leche.

Los mecanismos que explican la unión a estas estructuras son los mismos que se aplican para la unión a proteínas presentes en la sangre. A su vez, existe una constante de disociación K_{dis} , que determinará la fracción libre en el fluido extracelular (fLt) y que se encuentra en equilibrio con la fLp .

Esta relación de equilibrio permite realizar inferencias sobre las concentraciones de fármaco libre en el fluido extracelular (como es el caso de la leche), a partir de la determinación de las concentraciones plasmáticas, las que también repercutirán sobre la interpretación del V_d (Armijo, 2004; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b; Aleixandre y Puerro, 2005).

En conclusión, la difusión de un ATM desde la sangre hacia la leche, se ve determinado principalmente por la ley de Fick y la fLp . A su vez, los fenómenos de reparto en función del pH y trampa iónica, así como la unión a componentes de la leche determinarán la acumulación del ATM, en la misma.

1.4. MARBOFLOXACINA

La MFX (figura 5) es una fluoroquinolona de segunda generación diseñada para uso veterinario exclusivo. A partir de su desarrollo por el laboratorio Vetoquinol, con la especialidad Marbocyl®, se ha incrementado su empleo en la clínica habitual, debido principalmente a las características que diferencian a la MFX de otras fluoroquinolonas del mercado.

Presenta una estructura plana que consiste en un núcleo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, el cual confiere actividad antibacteriana principalmente frente a bacterias Gram-negativas, y un átomo de flúor en posición 9, que extiende el espectro de actividad hacia algunas bacterias Gram-positivas. Por otra parte, la adición de un radical metilo al núcleo piperazínico incrementa el espectro de actividad hacia *Pseudomonas sp.* y bacterias del género *Mycoplasma*, mientras que la incorporación de un grupo metilo al núcleo piperazínico, incrementa la liposolubilidad de la molécula y mejora el V_d . La introducción de un grupo carboxilo en el carbono 6, y un átomo de oxígeno exocíclico en posición 7 conforman la porción de la molécula que se une a la ADN-girasa de la célula

bacteriana. Finalmente, la incorporación de un anillo oxadiazínico, y un grupo metilo en posición 3, mejora las características farmacocinéticas de la MFX, incrementando su biodisponibilidad y su semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) (Appelbaum y Hunter, 2000; Bolon, 2011).

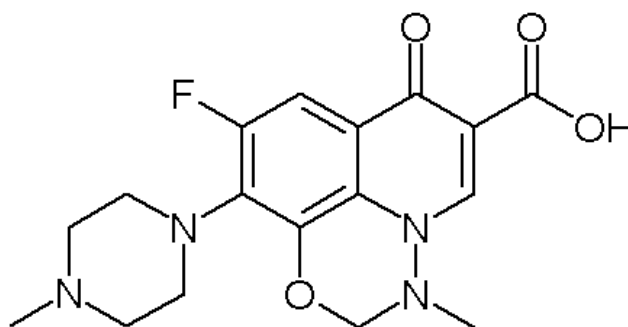


Figura 55: Estructura química de la MFX. 9-fluoro-2,3-dihidro-3metil-10(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido(3,2,1-ij)(4,1,2)benzoxadiacin-6-acido carboxílico].

1.4.1. MECANISMO DE ACCIÓN

La MFX, posee un efecto bactericida rápido frente a los microorganismos susceptibles. Hecho que hoy en día cobra cada vez más importancia desde el punto de vista clínico, principalmente cuando se tratan pacientes críticamente enfermos o que poseen un sistema inmunológico deprimido. Es un antimicrobiano clasificado como concentración dependiente con un efecto post-antibiótico significativo (Appelbaum y Hunter, 2000; USP, 2007; Bolon, 2011; Guiguère y Dowling, 2013).

Este efecto bactericida se produce por daño al ADN, lo que conduce a defectos en el superenrollamiento negativo. En bacterias Gram-negativas que poseen una pared gruesa compuesta por lipopolisacáridos, la MFX ingresa a través de porinas que facilitan su difusión, no viéndose afectada la pared celular. En el caso de microorganismos Gram-positivos, que no poseen una pared compuesta por lipopolisacárido, la MFX ingresa a la bacteria mediante un proceso de difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración. Una vez dentro del microorganismo, inhibe dos enzimas involucradas en la síntesis de ADN bacteriano: la ADN-girasa y la topoisomerasa IV. La topoisomerasa II (enzima presente en células eucariotas de animales) necesita una concentración 100

veces mayor a la necesaria para la inhibición de la topoisomerasa IV bacteriana. Esta toxicidad selectiva es la responsable de los escasos efectos adversos referenciados para fluoroquinolonas en mamíferos (EMEA, 1996; Gobernado y Santos, 2002; Oliphant y Green, 2002; Blondeau, 2004; Martínez *et al.*, 2006; González y Nieto, 2007; USP, 2007; Bolon, 2011; Guiguère y Dowling, 2013).

La función biológica de la ADN-girasa es introducir giros negativos en el ADN superenrollado por delante del sitio de replicación, lo que genera la relajación del ADN bacteriano. Esta actividad es esencial para el comienzo de la replicación del ADN, ya que permite la unión de proteínas iniciadoras de la replicación génica. Por otra parte, la ADN-girasa es esencial para el superenrollamiento posterior al ciclo de replicación. Esta enzima se encuentra compuesta por dos homodímeros (cuatro subunidades): 2 *GyrA* y 2 *GyrB*. La subunidad *GyrA* se une al ADN bacteriano y media la ruptura de la cadena y su posterior unión, mientras que la *GyrB* contiene el sitio de unión al ATP. La actividad de *GyrA* comprende el clivaje (la fragmentación) de ambas cadenas de ADN, el giro de ambas cadenas a través del sitio de ruptura, y la posterior unión. El resultado final son dos giros negativos en la cadena de ADN (Oliphant y Green, 2002; Blondeau, 2004; Martínez *et al.*, 2006; González y Nieto, 2007; USP, 2007; Bolon, 2011).

Por otra parte, la topoisomerasa IV es responsable de la relajación del ADN replicado, y la remoción del sitio de unión entre los cromosomas hermanos, permitiendo la segregación de cada uno de ellos a cada una de las células hijas, finalizando así el ciclo de replicación. La topoisomerasa IV se encuentra formada por dos homodímeros: 2 *parC* y 2 *parE* (Oliphant y Green, 2002; Blondeau, 2004; Martínez *et al.*, 2006; González y Nieto, 2007; USP, 2007; Bolon, 2011).

La MFX interactúa con la subunidad *GyrA* presente en la ADN-girasa, correspondiente al sitio de unión de la enzima al ADN bacteriano, a través de un residuo tirosina, generando modificaciones conformacionales, que resultan en la inhibición de la actividad enzimática normal. Como resultado, el nuevo complejo formado ADN-enzima-quinolona, impide en última instancia, la progresión del punto de replicación y la síntesis normal de ADN, la formación de complejos de transcripción génica, y por otra parte, bloquea el superenrollamiento de ADN. Esto lleva a la fragmentación del cromosoma, la inhibición de la síntesis proteica y la muerte celular (Gobernado y Santos, 2002; Oliphant

y Green, 2002; Blondeau, 2004; Martínez *et al.*, 2006; González y Nieto, 2007; Bolon, 2011).

El efecto de la MFX en la replicación bacteriana sugiere dos mecanismos de muerte celular. El primero de ellos, común a todas las fluoroquinolonas, requiere una síntesis de ARN y proteínas, por lo que es solamente efectivo frente a bacterias en división activa. Este mecanismo parece involucrar el bloqueo de replicación por la inhibición de la ADN-girasa. El segundo mecanismo requiere una síntesis activa de ARN y proteínas, pero no demanda que la bacteria esté en división activa. Este mecanismo puede estar correlacionado con el bloqueo de la topoisomerasa IV (Martínez *et al.*, 2006).

Como regla general, la actividad frente a bacterias Gram-negativas se relaciona principalmente con la inhibición de la ADN-girasa; mientras que frente a microorganismos Gram-positivos, el bloqueo de la topoisomerasa IV es el principal mecanismo de acción. Esta selectividad por los diferentes mecanismos tiene importantes implicancias en el desarrollo de resistencia observado en las quinolonas antiguas (Oliphant y Green, 2002; Blondeau, 2004; González y Nieto, 2007; Bolon, 2011).

Otros efectos adicionales se han relacionado al mecanismo de acción de las fluoroquinolonas, incluída la MFX tales como Gobernado y Santos (2002):

- Alteraciones en la pared celular bacteriana, probablemente por modificaciones en la síntesis de peptidoglicano, lo que incrementa la permeabilidad a los betalactámicos y otros ATMs, mayor sensibilidad a los detergentes y a la fijación del complemento, lo que incrementa la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares y macrófagos.
- Las quinolonas presentan una actividad antimicrobiana bifásica, esto es, presentan una actividad máxima a determinadas concentraciones por encima de las cuales la actividad bactericida disminuye, y luego vuelve a incrementarse tras un aumento mayor de la concentración. Este fenómeno puede explicarse debido a que a concentraciones que producen un efecto bacteriostático, no se sintetizarían las proteínas intervinientes en la actividad bactericida.

Las fluoroquinolonas son ATMs que presentan un gran efecto post antibiótico (EPA). El EPA puede definirse como el tiempo durante el cual permanece la inhibición del crecimiento bacteriano a partir del momento en el cual la concentración del ATM cae

por debajo de la CIM (Pastor y Cantón, 1999; Gobernado y Santos, 2002). El EPA puede calcularse *in vitro* o *in vivo*, considerándose el EPA *in vivo* como la diferencia de tiempo en que tarda en incrementarse 1Log10 de unidades formadoras de colonias, cuando la concentración del ATM disminuye por debajo de la CIM (Mouton *et al.*, 2005).

Durante la fase de EPA, las células bacterianas adoptan una morfología anormal, observándose frecuentemente con fluoroquinolonas las formas globosas o filamentosas. Se cree que el EPA se produce por varios mecanismos, entre los que pueden citarse la alteración en la expresión de factores de virulencia bacteriana; inhibición en las bombas de eflujo (dado que no pueden producir suficiente energía para hacer funcionar estos sistemas, debido al daño en la maquinaria metabólica celular) (Pastor y Cantón, 1999). La duración de los EPA producidos por las fluoroquinolonas es variable, entre 90 a 180 minutos (Gobernado y Santos, 2002).

1.4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los ATMs son compuestos invaluablemente ampliamente utilizados en salud humana y salud animal. Su uso reporta grandes beneficios a la sociedad si son utilizados racionalmente. Para que su utilidad permanezca a lo largo del tiempo es necesario minimizar la aparición de resistencia bacteriana, mediante el uso prudente y racional (EFSA, 2009).

El fenómeno de resistencia a los ATMs tuvo su inicio en el mismo instante en que estos últimos fueron utilizados por primera vez. La resistencia es consecuencia de la teoría de Darwin, la cual postula que todo ser vivo tiende a adaptarse al ambiente que lo rodea, principalmente mediante mutación genética y selección natural. Cuando los antimicrobianos comenzaron a ser utilizados en medicina, las bacterias comenzaron una carrera adaptativa inevitable, que con el tiempo llevarán a la aparición de resistencia a los ATMs, por selección ante la exposición al mismo. Se cree que los genes de resistencia a los ATMs podrían existir mucho antes que los ATMs se desarrollaran, ya sea en bacterias ambientales, o en forma de genes promotores que tras sufrir algunas mutaciones lograron transformarse en genes determinantes de resistencia bacteriana (EMEA, 1999). Es importante tener en cuenta que muchos antimicrobianos fueron descubiertos a partir de sustancias naturales, como los betalactámicos o los aminoglucósidos. Estas sustancias naturales son producidas por microorganismos

(hongos o bacterias) como mecanismo de defensa para luchar por nichos ecológicos. De modo que las poblaciones bacterianas ambientales ya estaban expuestas por un período prolongado de tiempo a estas sustancias, por lo que no es de entender que ya existieran genes de resistencia, previos al desarrollo de los ATMs. La tabla 4 muestra ejemplos de mecanismos de resistencia a los ATM aislados en poblaciones bacterianas productoras de sustancias homólogas a los ATM de uso moderno.

Tabla 4: Mecanismos de resistencia encontrados en bacterias del suelo productoras de antimicrobianos.

Antimicrobiano	Mecanismo de resistencia
Betalactámicos	Betalactamasas
	Proteínas fijadoras de penicilinas
	Acetiltransferasas
Aminoglucósidos	Fosfotransferasas
	Nucleotidiltrasnferasas
Cloranfenicol	Acetiltransferasas
Tetraciclinas	Sistemas de eflujo
	Protección ribosomal
Macrólidos	Metilación de ARN ribosomal
Estreptograminas	Esterasas
Lincosaminas	Fosfotransferasas
	Acetiltransferasas
Glicopéptidos	VanA-ligasa

Adaptado de: EMEA, 1999.

Para estos antimicrobianos derivados de sustancias naturales con actividad antibiótica, los principales mecanismos de resistencia probablemente surgieron cuando la información genética se transmitió desde las poblaciones ambientales hacia los patógenos de interés en medicina humana y veterinaria, y luego fueron ampliándose a medida que el uso de ATMs se hizo cada vez más masivo, a nivel mundial. La resistencia a los ATMs es actualmente uno de las problemáticas más importantes en salud humana y animal (EMEA, 1999; EFSA, 2009).

Los factores que predisponen al desarrollo de resistencia son básicamente la exposición del microorganismo a concentraciones subterapéuticas del ATM, y el uso masivo e indiscriminado de los mismos, tanto en el ámbito clínico como en producción animal. El primero promueve la selección de cepas mutantes moderadamente resistentes, que eventualmente pueden acumular mutaciones que le confieran una resistencia total. Por otra parte, el uso masivo e indiscriminado de ATMs redundan en una intensa presión de selección de mutantes resistentes, en una inmensa cantidad de poblaciones bacterianas a nivel mundial, lo que redundan en una diseminación de la resistencia bacteriana de manera más rápida y generalizada (EMEA, 1999; Papich, 2014; Singh y Tam, 2015).

Además de lo anteriormente expuesto, el uso indiscriminado de ATMs promueve el desarrollo de reservorios de resistencia. Uno de los reservorios de resistencia más estudiados y con mayor impacto en la diseminación de resistencia a los ATMs es la flora intestinal. A nivel intestinal se han identificado más de 200 especies bacterianas. La exposición de la flora intestinal a los ATMs conlleva finalmente el desarrollo de resistencia de estas poblaciones, las cuales actúan como reservorio. En el intestino, normalmente ingresan bacterias patógenas o potencialmente patógenas que permanecen durante un tiempo y son posteriormente eliminadas. La gran carga bacteriana intestinal, el contenido adecuado de agua y nutrientes, así como una temperatura adecuada y constante, favorece el intercambio de información genética (mediante intercambio de plásmidos, transposones o pili) entre las poblaciones bacterianas pertenecientes a la flora normal y las patógenas u oportunistas, por lo que la información genética determinante de resistencia a los ATMs es transferida rápidamente entre los microorganismos. La transmisión transversal de información genética de resistencia es mucho más eficiente y se disemina mucho más rápido que la transferencia vertical, de una generación de bacterias resistentes a otra, mediante división celular. Hay evidencia que las cepas resistentes reservorio pueden luego transmitirse a otros animales de la misma especie, a otras especies animales, de los animales al hombre, y del hombre a los animales (EMEA, 1999; EFSA, 2009).

Como prueba de esta realidad, puede citarse a modo de ejemplo, un caso de transmisión de un *S. aureus* metcilino-resistente de cabras hacia humanos. El caso fue reportado en una granja de Austria, donde se aisló inicialmente la cepa de *S. aureus* en

un animal sometido a necropsia. Tras el análisis a otros diez animales que convivían con la cabra infectada en el mismo box, se aisló el patógeno en seis de ellos. A pesar de que el primer análisis no resultó positivo para las personas que trabajaban en el establecimiento, dos semanas después en un nuevo muestreo para un segundo cultivo, uno de los trabajadores resultó positivo y se mantuvo con aislamientos positivos durante cuatro semanas más (Loncaric *et al.*, 2013).

Las fluoroquinolonas, por ser un grupo de ATMs sintetizados en laboratorio, no presentaban genes de resistencia en poblaciones bacterianas ambientales previo a su uso en medicina. Aun así, la resistencia apareció rápidamente tras su aparición en el mercado, y hoy en día existe evidencia de su diseminación hacia poblaciones bacterianas de vida silvestre (EMEA, 1999).

Los mecanismos de resistencia microbiana que los microorganismos desarrollan frente a las fluororquinolonas son complejos e involucran varias mutaciones en regiones determinantes de resistencia a las fluoroquinolonas (RDRF). En general las bacterias Gram-negativas son más propensas a desarrollar resistencia, aunque con el tiempo tiende a observarse en todas las bacterianas (Wasył *et al.*, 2014; Kao y Wu, 2015).

El mecanismo de resistencia de alto nivel, más común, es la acumulación de una o más mutaciones cromosómicas en los sitios diana de las fluoroquinolonas, en los RDRF. Los RDRF son secuencias cortas de ADN que cuando sufren mutaciones, generan sustituciones de aminoácidos que modifican los sitios de unión de las fluoroquinolonas en los genes *GyrA*, *GyrB*, *ParC* y *ParE*. Este mecanismo de resistencia implica varios pasos, de modo que inicialmente una mutación en los RDRF genera mutantes de primer paso de susceptibilidad reducida, mientras que la acumulación de sucesivas mutaciones produce mutantes de mayor resistencia, que finaliza con el desarrollo de resistencia absoluta (EFSA, 2009; Bolon, 2011; Wasył *et al.*, 2014; Kao y Wu, 2015). Generalmente la primera mutación es en el sitio principal de acción de la fluoroquinolona, el cual varía de acuerdo al microorganismo. En bacterias Gram-negativas, la primera mutación es generalmente en el gen *GyrA* o *GyrB*, debido a que en estos microorganismos la ADN-girasa es el principal sitio diana. Las mutaciones en *GyrA* suelen resultar en mutantes moderadamente resistentes con CIM entre 0,12 – 2,00 µg/ml, mientras que las mutaciones en el *GyrB* suelen presentar CIM no tan elevadas (entre 0,12 – 0,50 µg/ml). Mutaciones en ambos genes resulta en mutantes completamente resistentes (CIM ≥ 4

µg/ml) (Humphries *et al.*, 2012). En los microorganismos Gram-positivos las mutaciones en el gen *ParC* es en general la primera mutación observada en estafilococos y estreptococos, ya que la topoisomerasa IV es el principal sitio diana (Bolon, 2011).

Se asume que la tasa de mutación espontánea para mutantes de primer paso es de aproximadamente 10^{-9} a 10^{-7} . Esto quiere decir que en una población bacteriana, una pequeña subpoblación de mutantes de primer paso (moderadamente resistentes) coexiste con una gran población de bacterias susceptibles. Cuando exponemos estas poblaciones a un ATM, las bacterias susceptibles mueren, mientras que los mutantes de primer paso pueden ser seleccionados y formar colonias resistentes (Ferran *et al.*, 2007).

Aparentemente algunas mutaciones en otros sitios, fuera de los RDRF, podrían tener importancia en el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas. En las bacterias Gram-negativas el ingreso de las fluoroquinolonas es facilitado por canales proteicos denominados porinas. Uno de los transportadores más conocidos es el *OmpF* de *E. coli*. Las mutaciones cromosómicas en los genes *OmpF* que puedan alterar la expresión de este gen conllevan el desarrollo de resistencia.

Otro mecanismo de resistencia cromosómica que no involucra a los RDRF es el incremento en la expresión génica de bombas de eflujo, las cuales expulsan moléculas de características químicas similares fuera del microorganismo. Las bombas de eflujo no producen por si solas un nivel elevado de resistencia, aunque al permitir la supervivencia del microorganismo en presencia del antimicrobiano, predisponen a la selección de mutantes de primer paso (Bolon, 2011). Como ejemplo de incremento en la expresión génica de bombas de eflujo pueden citarse los genes *NorA* de *S. aureus* y la familia de transportadores tripartitos de los microorganismos Gram-negativos (Kao y Wu, 2015). En *E. coli* se han identificado cinco familias de bombas de eflujo cromosómicas, que son la familia ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator*), RND (*resistant nodulation-cell division*), SMR (*small multidrug resistance*) y MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*). Las más comunes son *acrAB* es una bomba de la familia RND frecuentemente involucrada en resistencia a varias moléculas, *emrE* y *mdfA* son bombas pertenecientes a las familias SMR y MFS, respectivamente, y *macB*, una bomba involucrada en la resistencia a macrólidos (Liu *et al.*, 2015).

Además de los mecanismos de resistencia cromosómica se encuentran la adquisición de resistencia mediada por plásmidos (RMP). Este tipo de resistencia relativamente

nuevo para las fluoroquinolonas permite a las bacterias compartir información de resistencia de manera mucho más rápida.

A diferencia de la resistencia cromosómica, la cual es transmitida exclusivamente de generación a generación, la resistencia mediada por plásmidos permite la transferencia horizontal. Una vez que un plásmido de resistencia aparece en una población bacteriana, esta información se comparte rápidamente con otras bacterias, incluso de especies y géneros diferentes. De hecho se identificaron los mismos plásmidos de resistencia en bacterias del género *Salmonella* sp y *Escherichia coli* comensales y provenientes de aves, en alimentos para animales (Wasył *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos de RMP lo constituye la familia de genes *qnr*, compuesta por más de 100 alelos divididos en grupos (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC*). Estos genes codifican para una proteína que se une a los sitios diana del cromosoma bacteriano y de esta manera evitan que las fluoroquinolonas puedan unirse al mismo para ejercer su acción farmacológica. Además de los genes *qnr* existen otras formas identificadas de RMP, entre las que pueden citarse un gen que codifica una enzima acetiltransferasa similar a la encontrada en la resistencia a aminoglucósidos denominado *aac(6')-Ib-cr*. Esta enzima acetila el nitrógeno amino del anillo piperazínico presente en este grupo de antimicrobianos. Por último, existe un mecanismo de RMP con sistemas de bombas de eflujo, como los *oqxAB* y *qepA* frecuentemente observado en enterobacterias. La característica de la RMP para fluoroquinolonas se caracteriza por no presentar una resistencia en dos pasos como se observa con los RDRF, sino que producen perfiles resistencia más leves, aunque una vez establecida, predisponen a la selección de mutaciones cromosómicas más graves (EFSA, 2009; Bolon, 2011; Wasył *et al.*, 2014; Kao y Wu, 2015; Liu *et al.*, 2015).

Humphries *et al.* (2012) y Wasył *et al.* (2014) mostraron que la aparición de resistencia moderada en *Salmonella* sp (CIM 0,12 y 2,00 µg/ml) podría estar parcialmente determinada por mecanismos de RMP, ya que en estas cepas se identificaron genes *qnr*, cuya presencia fue independiente de las mutaciones en las RDRF, lo que demuestra que en una misma cepa pueden coexistir mecanismos de resistencia cromosómicos y plasmídicos.

De manera similar, en un estudio realizado por Liu *et al.* (2015) con 78 cepas de *E. coli* aisladas de infecciones urinarias caninas, se observó una combinación de mutaciones

cromosómicas en los RDRF *gyrA* y *parC*, combinada con bombas de eflujo, y se informó de un incremento en la expresión génica de las bombas *acrAB*, *emrE* y *mdfA* junto a mutaciones *gyrA* y *parC* en cepas resistentes a MFX y asociadas a resistencia multifármaco. Los autores señalan la sobreexpresión de las bombas de eflujo como un potencial mecanismo de intensificación de resistencia a fluoroquinolonas.

En resumen, la resistencia a fluoroquinolonas es principalmente secuencial y compleja, entrando en juego mecanismos cromosómicos, así como mediados por plásmidos. Los mecanismos de RMP y los cromosómicos independientes de RDRF no producen resistencia de alto nivel, aunque predisponen a la selección de mutantes RDRF, altamente resistentes. Por otro lado, la resistencia mediada por plásmidos permite la diseminación rápida de resistencia (principalmente en enterobacterias), lo que genera un impacto no solo en la salud pública y animal, sino también a nivel ecológico, ya que las cepas resistentes seleccionadas en animales o en personas por el uso de fluoroquinolonas puede rápidamente alcanzar a cepas comensales de especies silvestres o del ambiente, conformando un reservorio de información genética de resistencia a las fluoroquinolonas. De esta manera, el uso prudente y racional de antimicrobianos en general, y quinolonas en particular, es un tema de interés general a nivel mundial, tanto en medicina humana como veterinaria (Papich, 2014).

1.4.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La MFX está indicada para el tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, digestivas, piodermias, otitis, infecciones de tejidos blandos y del aparato reproductor (endometritis, piómetra, mastitis, entre otras) (EMEA, 2000; Meunier *et al.*, 2004; Agencia Española del Medicamento, 2009; Guiguère y Dowling, 2013; Kroemer *et al.*, 2014).

De manera similar a otras fluoroquinolonas, la MFX posee buena actividad frente a microorganismos Gram-negativos (como enterobacterias, y *Pseudomonas aeruginosa*). También presentan actividad buena a moderada frente a estafilococos, micobacterias, micoplasmas, ureaplasmas y clamidias. Sin embargo, no presentan en general buena actividad frente a estreptococos, enterococos y bacterias anaerobias (González Gómez y Nieto Martínez, 2007; USP, 2007; Agencia Española del Medicamento, 2009; Guiguère y Dowling, 2013; Kroemer *et al.*, 2014).

Para MFX, los puntos de corte de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), para determinar la susceptibilidad de los patógenos son los siguientes:

Patógeno susceptible: $CIM \leq 1 \mu\text{g/ml}$; patógeno de susceptibilidad intermedia: CIM entre 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$; patógeno resistente: $CIM \geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Schenider *et al.*, 2004; USP; 2007; Papich y Riviere, 2009; Humpries *et al.*, 2012; Papich, 2013).

En nuestra revisión bibliográfica apenas hemos encontrado datos sobre sensibilidad antimicrobiana a MFX de patógenos aislados de la especie caprina u ovina. Por lo que, a continuación, se desarrolla la sensibilidad a la MFX de diferentes agentes etiológicos productores de mastitis y de otras enfermedades infecciosas en bovinos. La tabla 5 muestra los valores de CIM para los diferentes patógenos aislados entre los años 1994 – 2008, y la tabla 6 los valores de CIM_{50} y CIM_{90} reportados para cada patógeno en dicho período.

Los ECN aislados de mastitis bovinas ($n = 280$) comprenden el período 2004 – 2008. La CIM_{50} y CIM_{90} encontradas no se modificaron significativamente, y fueron similares a las descritas para *S. aureus* productores de mastitis bovinas. Solo 2 cepas de las 280 muestreadas fueron resistentes a MFX, con $CIM \geq 4 \mu\text{g/ml}$ (Kroemer *et al.*, 2014).

Con respecto a *S. aureus* procedentes de mastitis bovinas entre los años 1994 – 2008 ($n = 1208$), las CIM_{50} y CIM_{90} mostraron una distribución unimodal, aunque se observó un ligero incremento entre los períodos 1994 – 2001 y 2002 – 2008 (tabla 6). Sin embargo, tanto Meunier *et al.* (2004) en el período 1994 – 2001 como Kroemer *et al.* (2014) y Thomas *et al.* (2015) en el período 2002 – 2008, no constataron diferencias en las CIM_{50} y CIM_{90} durante la realización de sus estudios. Únicamente 2 cepas de entre las 1.208 aisladas en este período de tiempo fueron resistentes a la MFX.

Un estudio realizado por Marín *et al.* (2010) a partir de 32 cepas de *S. aureus* aislados de mastitis caprinas en España, constatan para la MFX una CIM_{50} de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ y una CIM_{90} de 1,00 $\mu\text{g/ml}$. De las 32 cepas, 24 presentaron una $CIM < 1,00 \mu\text{g/ml}$, mientras que 5 presentaron CIM de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 3 una CIM de 2 $\mu\text{g/ml}$. De esta manera, todas las cepas estudiadas resultaron sensibles a MFX. Estos resultados podrían indicar una menor sensibilidad a la MFX de las cepas de *S. aureus* aisladas en caprinos con respecto a las procedentes de mastitis bovina (tabla 6).

Tabla 5: Evolución de las CIM para MFX de diferentes patógenos aislados en bovinos.

Microorganismo	Origen	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	1994 - 2001 ^a	2002 – 2008	
ECN	Mastitis	$\leq 0,06$	-	0,71% ^b	
		0,06 - 1,00	-	98,58% ^b	
		2,00 - 4,00	-	-	
		$\geq 4,00$	-	0,71% ^b	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mastitis	$\leq 0,06$	1,80%	-	
		0,06 - 1,00	98,20%	99,3% ^b	95,6% ^c
		2,00 - 4,00	-	0,35% ^b	0,4% ^c
		$\geq 4,00$	-	0,35% ^b	-
Estreptococos	Mastitis	$\leq 0,06$	96,60%	0,34% ^b	-
		0,06 - 1,00	2,80%	92,02% ^b	54,96% ^c
		2,00 - 4,00	0,60%	7,3% ^b	44,33% ^c
		$\geq 4,00$	-	0,34% ^b	0,71% ^c
<i>Escherichia coli</i>	Mastitis	$\leq 0,06$	96,60%	91,9% ^b	81,43% ^c
		0,06 - 1,00	2,80%	6,32% ^b	17,86% ^c
		2,00 - 4,00	0,60%	-	-
		$\geq 4,00$	-	1,78% ^b	0,71% ^c
<i>Escherichia coli</i>	Infección intestinal	$\leq 0,06$	65,90%	-	
		0,06 - 1,00	20,70%	-	
		2,00 - 4,00	13,40%	-	
		$\geq 4,00$	-	-	
<i>Salmonella sp.</i>	Infección intestinal	$\leq 0,06$	89,30%	-	
		0,06 - 1,00	10,70%	-	
		2,00 - 4,00	-	-	
		$\geq 4,00$	-	-	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Infección respiratoria	$\leq 0,06$	71,10%	66,73% ^b	
		0,06 - 1,00	25,90%	31,52% ^b	
		2,00 - 4,00	3,00%	-	
		$\geq 4,00$	-	1,75% ^b	
<i>Pasteurella multocida</i>	Infección respiratoria	$\leq 0,06$	90,60%	84,69% ^b	
		0,06 - 1,00	9,00%	15,05% ^b	
		2,00 - 4,00	0,40%	0,27% ^b	
		$\geq 4,00$	-	-	
<i>Mycoplasma bovis</i>	Infección respiratoria	$\leq 0,06$	-	-	
		0,06 - 1,00	-	73,68% ^b	
		2,00 - 4,00	-	25,15% ^b	
		$\geq 4,00$	-	1,17% ^b	

ECN: estafilococos coagulasa negativos. Meunier *et al.*, 2004^(a); Kroemer *et al.*, 2014^(b); Thomas *et al.*, 2015^(c).

Los estreptococos aislados de mastitis bovinas en el período 1994 – 2008 ($n = 1.596$) presentaron una distribución unimodal tanto de la CIM₅₀ como de la CIM₉₀, sin observarse cambios en las mismas entre 1994 – 2001 y 2002 – 2008. Aparentemente podría existir una diferencia entre ambos períodos de tiempo, que se observa también en el caso de *S. aureus* (Tabla 5). Puede observarse como, en ambos periodos, las CIM₅₀ y CIM₉₀ de los estreptococos son superiores a las de *S. aureus* lo cual (unido a que 31 cepas resultaran resistentes a MFX) nos indica que el género *Streptococcus* sp presenta menor sensibilidad a la MFX que el género *Staphylococcus* sp. (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015).

Tabla 6: CIM₅₀ y CIM₉₀ de los patógenos aislados en bovinos en el período 1994 – 2008.

Microorganismo	Origen	1994 - 2001		2002 – 2008			
		CIM ₅₀ ^a	CIM ₉₀ ^a	CIM ₅₀ ^b	CIM ₉₀ ^b	CIM ₅₀ ^c	CIM ₉₀ ^c
ECN	Mastitis	-	-	0,250	1,000	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mastitis	0,150	0,280	0,250	0,500	0,250	0,500
Estreptococos	Mastitis	0,700	1,180	1,000	2,000	1,000	2,000
<i>Escherichia coli</i>	Mastitis	0,012	0,018	0,030	0,030	0,030	0,060
<i>Escherichia coli</i>	Intestinal	0,014	2,766	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp.	Intestinal	0,015	0,072	-	-	-	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Respiratorio	0,026	0,240	0,030	0,250	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	Respiratorio	0,012	0,141	0,015	0,120	-	-
<i>Mycoplasma bovis</i>	Respiratorio	-	-	1,000	2,000	-	-

Las CIM se expresan en µg/ml. Meunier *et al.*, 2004^(a); Kroemer *et al.*, 2014^(b); Thomas *et al.*, 2015^(c).

Las cepas de *E. coli* aisladas de mastitis bovinas, durante el período 1994 – 2008 ($n = 1.334$) presentaron una distribución bimodal en el período 1994 – 2001. En el año 1997, 1998 y 2001 se reportaron cepas con una CIM de 0,25 µg/ml, mientras que en los años 1999 y 2001 se reportaron cepas con una CIM de 0,50 µg/ml. Esta subpoblación representó el 2,80% de las cepas aisladas, y solo el 0,60% resultó resistente a la MFX. De todos modos, en este período no se observaron modificaciones en la CIM₅₀ y CIM₉₀ (Meunier *et al.*, 2004). Con respecto a los años 2002 – 2008 se reportó una distribución trimodal con la mayoría de las cepas de elevada susceptibilidad y dos subpoblaciones, una con susceptibilidad reducida (CIM entre 0,12 y 1,00 µg/ml) y otra subpoblación resistente (CIM ≥ 4 µg/ml). Del mismo modo, tampoco se reportaron modificaciones en las CIM₅₀ y CIM₉₀ (tabla 5 y 6) (Kroemer *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015).

Las cepas de *E. coli* de origen intestinal aisladas en el período 1994 – 2001 ($n = 634$) presentaron una distribución trimodal, con una subpoblación de elevada susceptibilidad y otras dos subpoblaciones (tablas 5 y 6). La primera presentó una susceptibilidad a la MFX reducida (CIM entre 0,12 y 1,00 $\mu\text{g/ml}$), y la segunda una subpoblación resistente con CIM entre 2,00 y 32,00 $\mu\text{g/ml}$. Ambas subpoblaciones se hallaban presentes al inicio del estudio en el año 1994, lo que indicaría que la resistencia adquirida a MFX fue cruzada a partir de otras quinolonas utilizadas en bovinos. La CIM₅₀ no presentó modificaciones a lo largo del estudio, mientras que la CIM₉₀ mostró un incremento significativo, lo que indica el progresivo desarrollo de resistencia a lo largo del tiempo. La diferencia en el mayor desarrollo de resistencia entre las *E. coli* de origen intestinal y las productoras de mastitis bovina podría deberse a que, en el sistema gastrointestinal, la transmisión de información genética para la adquisición de resistencia a los antimicrobianos es más probable y frecuente que en otras localizaciones (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014).

Las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de infecciones intestinales en bovinos, entre los años 1994 y 2001 ($n = 309$) mostraron una distribución bimodal, con una subpoblación de elevada susceptibilidad y otra con susceptibilidad reducida (CIM entre 0,12 y 1,00 $\mu\text{g/ml}$). No se observaron diferencias en las CIM₅₀ y CIM₉₀ (tablas 5 y 6). Todas las cepas resultaron susceptibles a la MFX en el período de tiempo estudiado (Meunier *et al.*, 2004).

Las cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de infecciones respiratorias bovinas ($n = 1.054$) en el período 1994 – 2008, presentaron una distribución trimodal, con una subpoblación altamente susceptible, otra de susceptibilidad reducida (CIM entre 0,12 y 1,00 $\mu\text{g/ml}$) y una subpoblación resistente (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$). Estas subpoblaciones se identificaron al inicio del estudio, indicando una posible resistencia cruzada con otras fluoroquinolonas. Las CIM₅₀ y CIM₉₀ no sufrieron modificaciones significativas durante este período (tablas 5 y 6). El 97,00% de las cepas resultaron sensibles a la MFX en el período 1994 – 2001, y 98,25% en el período 2002 – 2008 (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014).

Las cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de infecciones respiratorias en bovinos ($n = 1.572$) en el período 1994 – 2008, presentaron una distribución bimodal, con una subpoblación altamente susceptible, y otra subpoblación de susceptibilidad intermedia

(CIM entre 0,12 y 2,00 µg/ml). Las CIM₅₀ y CIM₉₀ no sufrieron modificaciones significativas. Todas las cepas aisladas fueron sensibles a la MFX (tablas 5 y 6).

En resumen, no se observó una disminución en la sensibilidad de los principales patógenos causantes de mastitis, así como tampoco en los principales agentes etiológicos productores de infecciones respiratorias en bovinos. Entre los patógenos productores de mastitis, *E. coli* es el patógeno más sensible a la MFX, seguido de *S. aureus* y los estreptococos. Los ECN, *S. aureus* y los estreptococos mostraron una distribución unimodal, aunque los estreptococos presentaron una sensibilidad menor que el género *Staphylococcus*. El género *Staphylococcus* presentó una CIM de 0,25 µg/ml, similar a otras fluoroquinolonas (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014). Por otra parte, *E. coli*, *M. haemolytica* y *P. multocida* mostraron distribuciones bi o trimodales. Estas subpoblaciones son originadas por mutaciones cromosómicas en las regiones determinantes de resistencia a las fluoroquinolonas de los genes *GyrA* y *ParC* que codifican para las enzimas ADN-girasa y topoisomerasa IV, intervinientes en el mecanismo de acción de las fluoroquinolonas. Estas mutaciones ocurren típicamente en dos pasos. Inicialmente se produce una mutación en algunos de los genes intervinientes que generan mutantes de primer paso con una susceptibilidad reducida, mientras que tras la acumulación de una segunda mutación, los mutantes de primer paso se transforman en mutantes totalmente resistentes a la fluoroquinolona (Varon *et al.*, 1999; Wetzstein, 2005; Homma *et al.*, 2007; Kroemer *et al.*, 2014). Estas mutaciones aparecen al azar en una población bacteriana previo a la exposición del ATM. De esta manera, la probabilidad de aparición de subpoblaciones resistentes a lo largo del tiempo, es un fenómeno típico del uso de fluoroquinolonas en general.

Las quinolonas en general, se indican para el tratamiento de la mastitis, mediante administración por vía parenteral, ya que de este modo el fármaco penetra en todo el tejido glandular mamario de manera uniforme. La vía intramamaria no se encuentra indicada en casos de mastitis clínicas profundas, ya que muchas veces los canalículos mamarios suelen obstruirse con detritos, impidiendo un acceso adecuado del ATM al sitio de infección (Smith y Sherman, 2009).

Marbofloxacin está indicada para el tratamiento de infecciones de diversos sistemas orgánicos en diferentes especies de rumiantes. En bovinos, está aprobado su uso para el tratamiento de infecciones respiratorias, digestivas, reproductoras y en el tratamiento

de las mastitis (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014). La MFX, gracias a su espectro de acción, posee buena actividad frente a la mayoría de los patógenos causantes de mastitis, por lo que sería una buena segunda opción terapéutica para el tratamiento de esta patología en el ganado caprino, teniendo en cuenta los problemas crecientes de resistencia a los principales grupos de ATMs utilizados para el tratamiento de mastitis caprina tales como los betalactámicos o macrólidos (Thomas *et al.*, 2015).

1.4.4. FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA

1.4.4.1. ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

La MFX presenta un comportamiento farmacocinético similar a otras fluoroquinolonas de segunda y tercera generación. Si bien existen diferencias entre los compuestos y entre especies animales, como regla general puede decirse que las fluoroquinolonas poseen una rápida absorción tras la administración oral en monogástricos y prerrumiantes. En general, se observan biodisponibilidades orales que oscilan entre un 50 – 90%, dependiendo principalmente de la especie. Por otra parte, los caninos, felinos y cerdos, presentan biodisponibilidades orales entre 75% y 100%. Para el caso de rumiantes, los valores de biodisponibilidad observados en diferentes fluoroquinolonas (incluida la MFX) son variables de acuerdo a la especie. En el caso de las ovejas, la biodisponibilidad oral de la enrofloxacin fue del 60%. En otros rumiantes adultos, las fluoroquinolonas presentan generalmente biodisponibilidades orales que oscilan entre 10 y 50%. Este hecho parece deberse a la adsorción del fármaco al contenido presente, y a la quelación con cationes divalentes (EMEA, 2000; Matínez *et al.*, 2006; González y Nieto, 2007; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

En la tabla 7 se exponen datos de biodisponibilidad oral (F), concentración máxima en sangre (C_{max}) y el tiempo máximo (T_{max}) correspondiente a MFX para diferentes especies.

Tras la administración parenteral, la biodisponibilidad de MFX es en general alta en todas las especies estudiadas, presentando valores cercanos al 100% en todos los casos (tablas 8 y 9). En ocasiones la administración intramuscular de ciertas formulaciones puede resultar en un retraso en la absorción, que puede acompañarse por un incremento en la semivida de eliminación (González Gómez y Nieto Matínez, 2007; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009).

Tabla 7: biodisponibilidad de MFX administrada por vía oral en diferentes especies.

Especie	Dosis (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)
Caninos	2,00	100,00 ^a ; 99,80 ^b	1,40 ^a ; 1,30 ^b ; 1,50 ^g ; 2,50 ^c	2,50 ^a ; 1,80 ^g ; 2,10 ^c
Felinos	2,00	79,00 ^f	1, 80 ^f	1,60 ^f
Equinos	2,00	62,40 ^d	0,90 ^d	0,60 ^d
Cerdos	2,50	107,90 ^e	1,00 ^e	3,80 ^e

F: biodisponibilidad absoluta; C_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo correspondiente a la C_{max}. Schneider *et al.*, 1996 (^a); Cester *et al.*, 1996 (^b); Frazier *et al.*, 2000 (^c); Bousquet–Melou *et al.*, 2002 (^d); Heinen, 2002 (^e); Albarellos *et al.*, 2005 (^f); Ding *et al.*, 2010 (^g).

Tabla 8: Biodisponibilidad de MFX tras la administración intramuscular en diferentes especies.

Especie	Dosis (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)
Bovinos lactantes	2,00	107,60 ^a	1,70 ^{ae}	1,20 ^a ; 0,70 ^e
	2,00	-	1,40 ^c	1,00 ^c
Bovinos	2,00	-	1,80 ⁱ	0,60 ⁱ
	10,00	-	7,90 ^j	1,30 ^j
Bovinos Hanwoo	2,00	73,00 ^k	1,16 ^k	0,95 ^k
Ovejas	2,00	106,30 ^g	0,80 ^g	0,60 ^g
Ovejas lactantes	2,50	86,00 ^a	2,70 ^a	0,80 ^a
Cabras	2,00	100,70 ^b	1,90 ^b ; 1,20 ^h	0,90 ^b ; 0,50 ^h
Equinos	2,00	87,90 ^d	1,40 ^d	0,90 ^d
Cerdos	2,50	110,20 ^f	1,81 ^f	0,71 ^f

F: Biodisponibilidad absoluta; C_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo máximo; (-): no reportado. Shem Tov *et al.*, 1997 (^a); Waxman *et al.*, 2001 (^b); Ismail y El-Kattan, 2007 (^c); Carretero *et al.*, 2002 (^d); Schneider *et al.*, 2004 (^e); Ding *et al.*, 2010 (^f); Sidhu *et al.*, 2010a(^g); Sidhu *et al.*, 2010b (^h); Sidhu *et al.*, 2011(ⁱ); Vallé *et al.*, 2012 (^j); Belew *et al.*, 2015(^k).

Tabla 9: Biodisponibilidad de MFX tras la administración subcutánea en diferentes especies.

Especie	Dosis (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)
Caninos	2,00	99,00 ^a	1,50 ^a	1,00 ^a
Equinos	2,00	97,60 ^b	1,10 ^b	0,70 ^b
Cabras	2,00	96,70 ^{c*}	1,80 ^c	1,20 ^c

F: Biodisponibilidad absoluta; C_{max}: concentración máxima; t_{max}: tiempo máximo; nd: no determinado. Schneider *et al.*, 1996 (^a); Bousquet – Melou *et al.*, 2002 (^b); Waxman *et al.*, 2007 (^c). La biodisponibilidad en cabras fue calculada en base al área bajo la curva reportada por Waxman *et al.*, 2001 (^{c*}).

1.4.4.2. DISTRIBUCIÓN

En general, la distribución de las fluoroquinolonas a los diferentes tejidos es muy buena, llegando a observarse un V_d hasta tres veces superior que el encontrado con betalactámicos o aminoglucósidos. En la mayoría de los tejidos, salvo cerebro y ojos, las fluoroquinolonas alcanzan concentraciones tisulares al menos tan altas como las observadas en la sangre. Las concentraciones alcanzadas en el fluido intersticial, piel y hueso oscilan entre el 30% - 100% de las correspondientes en suero. Mientras que, en secreciones bronquiales y tejido prostático, se alcanzan valores similares a las concentraciones séricas, pudiendo llegar a ser en estos últimos entre dos y tres veces superiores a las concentraciones séricas, debido a un fenómeno de atrapamiento iónico. La penetración en el líquido cefalorraquídeo es aproximadamente un 25% de la correspondiente en suero, alcanzando concentraciones terapéuticas. Por otra parte, las concentraciones observadas en humor acuoso son eficaces frente a bacterias Gram-negativas. Igualmente, se observan altas concentraciones en bilis y diferentes órganos de excreción como hígado, intestino y riñones (EMEA, 2000; Walker y Dowling, 2006; González Gómez y Nieto Martínez, 2007; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

Asimismo, las fluoroquinolonas logran altas concentraciones intracelulares en células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos, reportándose 4 a 10 veces a las presentes en suero. Este hecho posee relevancia terapéutica en infecciones por patógenos intracelulares tales como *Brucella* sp., *Mycoplasma* sp. y *Mycobacterium* sp.

Este fenómeno de acumulación en células fagocíticas podría ser beneficioso debido a una acumulación del fármaco en tejidos infectados. Los leucocitos, a través de la quimotaxis, podrían transportar el ATM al sitio de infección. Este hecho fue demostrado en perros con pioderma superficial y profunda, en donde se observaron mayores concentraciones de enrofloxacin en comparación con animales control, y se observó una relación directa entre el recuento tisular de leucocitos y la concentración de enrofloxacin (Walker y Dowling, 2006; González Gómez y Nieto Matínez, 2007; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009).

La unión a proteínas plasmáticas (tabla 10) es en general relativamente baja, y no mostró ejercer un efecto apreciable sobre la distribución de las fluoroquinolonas a los diferentes tejidos corporales (EMEA, 2000; Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

Tabla 10: Porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de diferentes fluoroquinolonas en diversas especies animales.

Animal	Enrofloxacin	Ciprofloxacin	Marbofloxacin	Orbifloxacin
Camello	17 – 24	-	-	-
Bovino	56; 36 – 45; 60; 46	31; 70; 19	29 – 27 ^{c*} ; 32 ^d ; 52 ^e	-
Oveja	69	-	-	-
Equino	22	37	-	21
Cerdo	27	24; 35		
Canino	15 – 25; 27; 35; 72	44; 19	9; 22 ^b ; 25 ^a	13
Conejo	53; 50; 35; 6	33; 28	-	-
Pollo	21	30	-	-
Ratón	42	-	-	-
Rata	50	-	-	-

Nota: La variabilidad en los resultados puede ser consecuencia de los métodos de extracción utilizados; (-): no reportado. De: Papich y Riviere, 2009; Bregante *et al.*, 2000 (^a); Bidgood y Papich, 2005 (^b); Ismail y El-Kattan, 2007 (^c); Illambas *et al.*, 2013 (^d); Cao *et al.*, 2015(^e). (*): se informó una unión a proteínas séricas de 29% en animales sanos y 27% en enfermos.

La distribución tisular de la MFX es similar a otras fluoroquinolonas. En general, posee V_d superiores al agua corporal total (1 L/Kg), lo que indicaría una buena penetración a diversos tejidos, y fluidos extra e intracelulares (tabla 11) (EMEA, 2000; Walker y Dowling, 2006; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

Tabla 11: Volúmenes de distribución de MFX en diferentes especies.

Especie	Dosis (mg/kg)	V_{ss} (L/Kg)
Bovinos	2,00	1,10 ^{gh} ; 1,50 ^b ; 1,02 ^j
Ovejas	2,00	0,60 ^b ; 2,00 ⁱ
Cabras	2,00	1,30 ^c
Caninos	2,00	1,90 ^{a*}
Felinos	2,00	1,00 ^f
Equinos	2,00	1,50 ^d ; 1,20 ^e

V_{ss} : volumen de distribución en estado estacionario; (*): Los datos corresponden a valores de volumen de distribución aparente del área. Schneider *et al.*, 1996 (^a); Shem-Tov *et al.*, 1997 (^b); Waxman *et al.*, 2001 (^c); Bousquet-Melou *et al.*, 2002 (^d); Carretero *et al.*, 2002 (^e); Albarellos *et al.*, 2005 (^f); Aliabadi y Lees, 2002 (^g); Ismail y El-Kattan, 2007 (^h); Sidhu *et al.*, 2010a (ⁱ); Belew *et al.*, 2015(^j).

1.4.4.3. ELIMINACIÓN

Las fluoroquinolonas son eliminadas del organismo principalmente mediante metabolismo hepático y excreción renal, ya sea a través de filtración glomerular o secreción tubular por transporte activo. La importancia del metabolismo hepático y las vías metabólicas involucradas para tal fin dependen de cada compuesto en particular. Muchos metabolitos primarios de las quinolonas poseen actividad antimicrobiana, pero en general, presentan una eliminación más breve que el compuesto original (como la biotransformación hepática de enrofloxacin en ciprofloxacina) (EMEA, 2000; González Gómez y Nieto Matínez, 2007).

La oxidación, hidroxilación, metilación y glucuronoconjugación, son las reacciones más importantes en el metabolismo hepático de las fluoroquinolonas. Generalmente las modificaciones químicas ocurren a nivel del anillo piperazínico y a sus sustituyentes. Debido a que algunas fluoroquinolonas pueden ser eliminadas mediante excreción biliar

y transintestinal, puede ocurrir recirculación enterohepática, debido a la presencia de β -glucuronidasas intestinales, las cuales podrían liberar al compuesto activo o sus metabolitos secundarios, permitiendo la posterior reabsorción de los mismos (González Gómez y Nieto Matínez, 2007).

Con respecto a la semivida de eliminación ($t_{1/2}$), las quinolonas presentan diferencias importantes entre especies, así como también entre diferentes estados fisiológicos. Las diferencias más importantes ocurren entre monogástricos (perros, gatos, cerdos y caballos) y rumiantes (vacas, ovejas y cabras). En los primeros, se observan $t_{1/2}$ mayores que en los segundos. Asimismo, existen diferencias entre animales adultos y jóvenes, éstos últimos presentan en general mayores $t_{1/2}$. Esta diferencia se observa de forma marcada en rumiantes, los bovinos pre-rumiantes suelen presentar mayores $t_{1/2}$ que los animales adultos. Estas observaciones se atribuyen a un menor aclaramiento plasmático (Cl) en animales jóvenes, debido principalmente a una inmadurez en los órganos de eliminación (Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

Gran parte de la MFX presente en el organismo es eliminada sin metabolizar. Aproximadamente se eliminan dos tercios por vía renal y un tercio por vía biliar. Las fluoroquinolonas tienden a acumularse en orina, alcanzando concentraciones más elevadas que en sangre. Esto se observa con muchos compuestos y en varias especies. La biotransformación hepática oscila entre el 5 - 15% y da lugar a dos metabolitos: N-óxido-MFX y desmetil-marbofloxacin (EMA, 2000; USP, 2007). Este último posee actividad antibacteriana débil. Los valores de Cl y $t_{1/2}$ de MFX por diferentes vías se exponen en la tabla 12. Al igual que sucede con otras fluoroquinolonas, la MFX presenta diferencias importantes entre animales jóvenes y adultos. En cabras de 1 y 3 semanas de edad, la $t_{1/2}$ reportada fue de 9,66 y 8,25 h, respectivamente, mientras que en cabras adultas fue de 7,18 h. Los autores atribuyen estas diferencias a menores valores de Cl observados en los animales jóvenes, debido principalmente a una inmadurez de los mecanismos de metabolismo y eliminación (Waxman *et al.*, 2001; Waxman *et al.*, 2004).

Yohannes *et al.* (2014), mediante un estudio de alometría realizado en ocho especies de mamíferos (conejo, gato, perro, cabras, ovejas, cerdos, vacas y burros), demuestra como el Cl presenta una asociación directa con el peso vivo. Por el contrario, la $t_{1/2e}$ y el V_{ss} no presentaron correlación con el peso vivo. Por esta razón, los autores afirman que dado que la extrapolación alométrica directa entre especies no es aconsejable, y

teniendo en cuenta la importancia de la $t_{1/2e}$ en el diseño de esquemas posológicos, es necesario un diseño de protocolos terapéuticos basados en datos farmacocinéticos propios de la especie en la que se quieren aplicar.

Tabla 12: Semivida ($t_{1/2}$) de MFX en diferentes especies, tras administración endovenosa (IV), oral (PO), intramuscular (IM) y subcutánea (SC).

Especie	Dosis	CI (ml/kg/min)		$t_{1/2}$ (horas)		
		IV	IV	PO	IM	SC
Canino	2,00	1,70 ^b	12,40 ^b	9,80 ^a	-	14,00 ^b
Felino	2,00	1,50 ⁱ	8,00 ⁱ	6,60 ⁱ	-	-
Bovinos	2,00	3,50 ^e ; 3,00 ^j ; 4,83 ^q	2,10 ^c ; 4,20 ^e ; 4,60 ^j ; 2,44 ^q	-	4,30 ^e ; 4,70 ^j ; 5,20 ^o ; 2,24 ^q	-
Bovinos enfermos	10,00	-	-	-	17,50 ^p	-
Ovejas	2,00	8,00 ^m	2,20 ^c ; 3,60 ^m	-	2,30 ^c ; 3,30 ^m	-
Equinos	2,00	4,10 ^f ; 3,20 ^g	7,560 ^f ; 4,70 ^g	8, 80 ^f	5,50 ^g	10,40 ^f
Cerdos	2,50	2,00 ^l	7,90 ^l	23,10 ^l	17,30 ^l	-
Cabras	2,00	3,80 ^d	7,20 ^d	-	6,80 ^d ; 2,90 ⁿ	5,70 ^k

(-): no reportado. Cester *et al.*, 1996 (^a); Schneider *et al.*, 1996 (^b); Shem Tov *et al.*, 1997 (^c); Waxman *et al.*, 2001 (^d); Aliabadi y Lees, 2002 (^e); Bousquet-Melou *et al.*, 2002 (^f); Carretero *et al.*, 2002 (^g); Heinen *et al.*, 2002 (^h); Albarellos *et al.*, 2005 (ⁱ); Ismail y El-Kattan, 2007 (^j); Waxman *et al.*, 2007 (^k); Ding *et al.*, 2010 (^l); Sidhu *et al.*, 2010a (^m); Sidhu *et al.*, 2010b (ⁿ); Sidhu *et al.*, 2011(^o); Vallé *et al.*, 2012 (^p); Belew *et al.*, 2015(^q).

1.4.5. TOXICIDAD Y CONTRAINDICACIONES DE LA MARBOFLOXACINA

Marbofloxacin, al igual que otras fluoroquinolonas, es un ATM bastante seguro. No obstante, se han descrito algunos efectos adversos relacionados con su toxicidad que se desarrollan a continuación. Muchos de los efectos adversos reportados con otras fluoroquinolonas u otras especies animales no han sido reportados para MFX tales como: toxicidad hepática y renal, fototoxicidad, toxicidad ocular, toxicidad hemática o toxicidad cardiovascular.

1.4.5.1. SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES

Los efectos adversos gastrointestinales son los observados con mayor frecuencia en fluoroquinolonas. Los síntomas suelen ser leves a moderados y autolimitantes. Entre los más comunes pueden citarse las náuseas, vómitos, inapetencia, cólicos y diarrea. Probablemente son debidos a la irritación de la mucosa gastrointestinal tras la administración oral, y son inespecíficos del compuesto utilizado (Gobernado y Santos, 2002).

1.4.5.2. SINTOMAS NEUROLÓGICOS

La sobredosificación de MFX puede producir signos neurológicos autolimitantes, que desaparecen con tratamiento sintomático (depresión, temores y convulsiones) (EMEA, 1996; EMEA, 2000). De todas maneras, no se observaron signos clínicos de sobredosificación a dosis tres veces superiores a la recomendada (Agencia Española del Medicamento, 2009). Los efectos adversos sobre el sistema nervioso podría deberse a la interacción de las quinolonas con el receptor del ácido gama-amino-butírico (GABA), produciendo su inhibición, hiperexcitabilidad neuronal a nivel encefálico y medular. Probablemente las sustituciones en posición 4 y 7 estén relacionadas con este efecto indeseable. La estimulación de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) podría ser otro mecanismo probable que explique los efectos indeseables en el sistema nervioso (Gobernado y Santos, 2002; Fish, 2001).

1.4.5.3. HIPERSENSIBILIDAD

Su frecuencia de aparición es baja (inferior al 2%), los síntomas más comunes son prurito, eritema y urticaria. Los cuadros anafilácticos o anafilactoides son extremadamente raros (Azanza, *et al.*, 2000).

1.4.5.4. ARTROPATÍAS

El uso de fluoroquinolonas ha sido asociado a artropatías, principalmente en animales en crecimiento. Este efecto adverso ha sido demostrado en vacas y gatos a dosis superiores a las recomendadas, aunque se ha reportado en algunos perros a dosis usuales. En general los estudios realizados utilizaron dosis altas o se realizaron

tratamientos prolongados. La MFX a una dosis de 11 mg/kg/día durante 14 días produjo inflamación y lesiones en el cartílago articular en perros de raza grande de 3 a 4 meses de edad (USP, 2007).

La administración intraarticular de fluoroquinolonas produjo necrosis de los condrocitos y erosión del cartílago articular, posiblemente por disfunción mitocondrial y disminución de la cantidad de glucosaminoglicano en el cartílago en crecimiento (Fish, 2001).

1.4.5.5. POTENCIAL TERATOGÉNICO, EMBRIOTÓXICO, MATERNOTÓXICO, GENOTÓXICO Y CARCINOGENICO

La MFX no mostró producir efectos teratogénicos, embriotóxicos ni maternotóxicos en estudios realizados en animales de laboratorio (ratas y conejos) a las dosis recomendadas. (EMA, 2000; USP, 2007; Agencia Española del Medicamento, 2009). Se observó embriotoxicidad (retraso en la osificación) tras una administración de 80 y 700 mg/kg/día en conejos y ratones respectivamente, mientras que se reportó maternotoxicidad a dosis de 30 y 80 mg/kg/día. De esta manera, el índice NOEL calculado para fetotoxicidad recomienda una dosis máxima de 30 y 85 mg/kg/día para conejos y ratones, respectivamente. Por otra parte, se observó una capacidad irritante moderada en la piel y ojos. MFX no mostró capacidad mutagénica en estudios de médula ósea e hígado de ratas, por lo que tampoco se considera a la MFX carcinogénica (EMA, 1996; EMA, 2000).

1.4.5.6. REACCIONES ADVERSAS PROPIAS DE LA MARBOFLOXACINA

La administración subcutánea e intramuscular puede inducir un edema transitorio. La administración intramuscular puede causar reacción dolorosa y lesiones inflamatorias en el punto de inyección que pueden durar varios días (USP, 2007; Agencia Española del Medicamento, 2009).

MFX mostró una toxicidad oral baja, con una dosis letal 50 (DL₅₀) que osciló entre 1.781 mg/kg a 3.772 mg/kg en ratones. La DL₅₀ en ratones tras la vía subcutánea osciló entre 972mg/kg y 2.094 mg/kg (EMA, 1996; EMA, 2000).

La toxicidad de MFX tras la administración de dosis elevadas en forma crónica en ratones, se encontró relacionada a mayor mortalidad y daño renal tras la administración de 600 mg/kg/día. También se reportó toxicidad testicular y artropatía a dosis entre 50 – 600 mg/kg/día, observándose testículos y epidídimos de menor tamaño, atrofia de los túbulos testiculares, oligospermia y granuloma espermático. De esta manera, el índice NOEL calculado a partir de los datos recomienda una dosis diaria máxima de 4 mg/kg/día (EMEA, 1996; EMEA, 2000).

En perros, la administración de 40 mg/kg/día de MFX por vía oral durante trece semanas produjo signos típicos de artropatía descritos para otras fluoroquinolonas, con alteraciones en el cartílago articular. También se observó atrofia de los túbulos testiculares y granuloma espermático en uno de cuatro animales estudiados. No se reportaron efectos adversos tras dosis de 1 y 4 mg/kg/día, por lo que el índice NOEL calculado recomendó también una dosis máxima de 4 mg/kg/día. Tampoco se observaron efectos indeseables en perros inmaduros tras una administración de 6 mg/kg/día durante trece semanas (EMEA, 1996; EMEA, 2000).

Dado que las fluoroquinolonas atraviesan bien la placenta, y debido a su potencial toxicidad sobre el cartílago articular, no se recomienda su administración en hembras gestantes. Con respecto a la lactación, se desconoce el impacto que tiene el uso de fluoroquinolonas en hembras en lactancia, ya que si bien hay evidencia que estos ATM alcanzan concentraciones similares o incluso superiores a las observadas en sangre, no se ha determinado que concentraciones se alcanzan en los cachorros lactantes (USP, 2007).

1.4.5.7. CONTRAINDICACIONES DE LA MARBOFLOXACINA

Las contraindicaciones más comunes para MFX y las fluoroquinolonas en general son:

- hipersensibilidad a las fluoroquinolonas.
- Uso en animales en crecimiento, de acuerdo a evidencia obtenida en gatos, perros y caballos.
- Epilepsia, y patologías del sistema nervioso que cursen con convulsiones.
- Insuficiencia hepática y renal, debido a un fenómeno de acumulación en el organismo.

1.5. MODELOS FARMACOCINÉTICOS/FARMACODINÁMICOS Y PARÁMETROS DE EFICACIA PARA FLUOROQUINOLONAS

En antibioticoterapia, el objetivo final no sólo se centra en procurar la curación clínica, sino también la curación bacteriológica, ya que si no se logra una erradicación bacteriana total, se incrementa el riesgo de ejercer una presión de selección muy fuerte que posibilite la selección de colonias menos susceptibles al ATM, que eventualmente puedan recolonizar al animal tras interrumpir el tratamiento, produciendo una reinfección con una población bacteriana más resistente, que puede ser diseminada a otros animales, al hombre y al medioambiente (Toutain *et al.*, 2002; Papich, 2014).

Muchos ensayos experimentales se basan exclusivamente en la monitorización de variables de tipo clínico, mientras que no toman en cuenta la curación microbiológica del paciente. Este fenómeno es explicado por el “efecto Pollyanna”, el cual se refiere al hecho de que en muchos casos, las variables de respuesta clínica, tales como la supervivencia, no suelen representar siempre una cura microbiológica. Existen muchos estudios que demuestran este fenómeno en medicina humana y veterinaria. Por el contrario, cuando se toma la curación microbiológica (mediante cultivo y recuento de colonias bacterianas) como variable de respuesta al tratamiento con ATMs, existen evidencias de que éstas últimas presentan una correlación significativa con el éxito terapéutico (Toutain *et al.*, 2002; McKellar *et al.*, 2004).

Esta deficiencia en los parámetros de respuesta clínica para determinar los regímenes posológicos idóneos para garantizar la cura bacteriológica, abre el camino para la aplicación de modelos de integración farmacocinéticos/farmacodinámicos y la aplicación de los parámetros correspondientes en animales sanos (Toutain *et al.*, 2002).

La integración de información farmacocinética, expresada en parámetros farmacocinéticos, con información farmacodinámica de un ATM, constituye lo que se denomina un modelo de integración PK/PD (siglas derivadas del inglés *pharmacokinetic / pharmacodynamic*). Estos modelos permiten generar parámetros de eficacia antimicrobiana, que permiten predecir la eficacia antimicrobiana *in vivo* a partir de datos de concentración plasmática o sérica, y datos de sensibilidad del patógeno en cuestión. Al mismo tiempo, el modelo incorpora dos fuentes (farmacocinética y farmacodinámica) de variación intra- e inter- individual.

Básicamente, los parámetros PK/PD expresan relaciones de exposición del microorganismo al ATM (Toutain *et al.*, 2002; Papich, 2014; Kitamura *et al.*, 2014).

Los modelos PK/PD surgen en los años 40 y 50, cuando el Dr. Eagle describió por primera vez el comportamiento tiempo dependiente de la penicilina, y concentración dependiente de la estreptomicina y la bacitracina. En la década de los 80 y 90 comenzaron a desarrollarse los conceptos básicos de los modelos PK/PD modernos en ratones, a partir de los cuales se desarrolló toda una metodología utilizada hoy en día para el desarrollo de nuevos antimicrobianos, diseño de posologías en ATMs ya existentes, cálculo de puntos de corte de sensibilidad y prevención de la aparición de resistencias (Canut Blasco *et al.*, 2015).

Para que un ATM pueda ejercer su acción, debe indefectiblemente alcanzar concentraciones efectivas en el sitio donde se encuentra la infección. Es por ello que todos los parámetros farmacocinéticos a incluir en un modelo PK/PD deben representar con la mayor exactitud posible las concentraciones presentes en el lugar de acción. Por lo que puede suponerse que las concentraciones tisulares deberían ser las idóneas, a la hora de generar los parámetros farmacocinéticos a ser incorporados en el modelo. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas han demostrado ser los mejores predictores de eficacia clínica para la mayoría de las infecciones en diferentes tejidos, ya que se encuentran en equilibrio con las concentraciones alcanzadas en el fluido extracelular. No en todos los casos es posible utilizar eficientemente concentraciones séricas de ATMs, debido a que en ocasiones las bacterias pueden localizarse en forma intracelular obligada o facultativa (*Mycoplasma*, *Chlamydiae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, entre otros) o bien existir barreras de exclusión para ATMs, ya sea fisiológicas (como la barrera hematoglandular en el tejido mamario) o patológicas (abscesos), que no permitan que las concentraciones de fármacos en plasma reflejen de forma fidedigna las concentraciones alcanzadas en el lugar de acción. En estos casos, se recomienda la utilización de concentraciones provenientes de esos territorios orgánicos (McKellar *et al.*, 2004; Papich, 2014).

La potencia de los ATMs se determina habitualmente mediante pruebas *in vitro*. Existen diferentes formas de expresarla. Una medida utilizada frecuentemente, es la concentración inhibitoria mínima (CIM), y la concentración bactericida mínima (CBM).

La CIM, se define como la mínima concentración de ATM que inhibe el crecimiento bacteriano (bacteriostasis), de un inóculo de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) en 1 ml de medio de cultivo, tras 18 – 24 horas de incubación. Las determinaciones de CIM se realizan usualmente en medios de cultivo líquidos, utilizando la técnica de doble dilución, y la medida se expresa como inhibición del 50 o 90 % de las colonias aisladas (CIM₅₀ y CIM₉₀, respectivamente). El parámetro farmacodinámico estandarizado para el cálculo de índices PK/PD, es la CIM₉₀ para todas las especies contra las cuales el ATM posee actividad. Dado que la CIM es el parámetro de referencia para el cálculo de todos índices PK/PD, su procedimiento de determinación debe ser estandarizado al fin de poder comparar los diferentes datos. Existe un organismo internacional que fija los estándares para la determinación de la CIM, el CLSI (por sus siglas en inglés *Clinical Laboratory Standards Institute*) (Aliabadi y Lees, 2002; Mouton *et al.*, 2002; San Andrés Larrea y Boggio, 2007; Papich, 2014).

La CBM se define como la concentración más baja del ATM que reduce el recuento bacteriano en un 99,9% ($3 \log_{10}$ UFC/ml), cuando un inóculo estandarizado se expone al fármaco durante un período fijo de tiempo (generalmente 18 – 24 horas de incubación) (Aliabadi y Lees, 2002; McKellar *et al.*, 2004; San Andrés Larrea y Boggio, 2007).

La determinación de la CIM o CBM es llevada a cabo utilizando concentraciones fijas del ATM, en cada dilución, durante un período de tiempo determinado. Este fenómeno no se observa nunca *in vivo*, ya que las concentraciones alcanzadas en el sitio de infección (excepto en el caso de infecciones de la sangre), siempre aumentan hasta alcanzar un pico y luego disminuyen gradualmente. En definitiva, las concentraciones en el sitio de infección nunca se mantienen constantes en el tiempo. Es por ello que la combinación de información farmacocinética con información farmacodinámica permite el diseño de regímenes de dosificación racionales, con objeto de optimizar la eficacia y minimizar los efectos indeseables tales como la aparición de resistencia, la toxicidad, o la presencia de residuos en productos de origen animal (Aliabadi y Lees, 2002).

Los parámetros PK/PD están compuestos de un parámetro farmacocinético y un parámetro microbiológico. La relación cuantitativa que surge entre ambos se denomina índice PK/PD (Mouton *et al.*, 2002; Papich, 2014).

En base al estudio de los parámetros PK/PD en modelos animales en laboratorio, se puede clasificar a los diferentes grupos de ATMs en tres categorías en función de la forma que adoptan los perfiles de las curvas de muerte vs tiempo: concentración dependiente, tiempo dependiente y concentración independiente.

Los ATM tiempo dependiente poseen un efecto post-antibiótico mínimo y una capacidad bactericida que es independiente de la concentración alcanzada, siempre y cuando la misma supere la CIM del patógeno; siendo el tiempo de exposición del ATM el que determinará su eficacia. Por el contrario, los ATM concentración dependiente presentan una relación lineal entre la tasa de muerte y la concentración plasmática alcanzada en el organismo, con un efecto postantibiótico marcado. Por último, los ATM concentración independiente incrementan la tasa de mortalidad bacteriana ligeramente ante incrementos en la concentración, aunque inhiben de forma eficaz el crecimiento bacteriano por tiempo prolongado (Toutain *et al.*, 2002; McKellar *et al.*, 2004; Canut Blasco *et al.*, 2015; Papich, 2014).

Entre los ATM concentración independiente podemos citar a la vancomicina, tetraciclinas, azitromicina, clindamicina o tigecilina. El parámetro de eficacia más adecuado para estos ATMs es el AUC_{0-24}/CIM (Canut Blasco *et al.*, 2015).

Los betalactámicos, sulfonamidas, macrólidos y cloranfenicol son antimicrobianos tiempo dependiente, en los que los parámetros AUC_{0-24}/CIM y/o $T > CIM$ (el tiempo que las concentraciones del ATM permanecen por encima de la CIM) son los más adecuados. Estos grupos de ATM no poseen en general un efecto post-antibiótico marcado, o directamente carecen de él. La mayoría de los ATM tiempo dependiente deben ser administrados frecuentemente (en general cada 6 a 8 horas) para poder mantener las concentraciones tisulares por encima de la CIM (Papich, 2014).

Por el contrario, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos, poseen una actividad antimicrobiana que no parece estar principalmente relacionada con el intervalo entre dosis, sino con la magnitud de las concentraciones alcanzadas, por lo que presentan un efecto bactericida dependiente de la concentración. Por ello, los regímenes de dosificación tienden a alcanzar las máximas concentraciones (no tóxicas) posibles. Los parámetros PK/PD relacionados con eficacia clínica para las fluoroquinolonas son el AUC_{0-24}/CIM y C_{max}/CIM . El parámetro AUC_{0-24}/CIM contempla el AUC observada hasta las 24 horas sobre la CIM del microorganismo, y se expresa en horas. El parámetro

C_{\max}/CIM es adimensional y se define como la C_{\max} observada sobre la CIM (Toutain *et al.*, 2002; USP, 2007; McKellar *et al.*, 2004; Papich, 2014; Cao *et al.*, 2015).

La mayoría de los parámetros PK/PD utilizan las concentraciones plasmáticas o séricas totales, por lo que no contemplan las concentraciones de ATM libre (no unida a proteínas plasmáticas). Como ya expusimos anteriormente, las concentraciones tisulares en el fluido extracelular se encuentran en equilibrio con la fracción de fármaco libre en plasma o suero. De modo que el cálculo de los indicadores de eficacia PK/PD basado en las concentraciones plasmáticas o séricas totales podría sobreestimar la exposición del ATM en el organismo, principalmente en aquellos fármacos con elevado porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (Papich, 2014).

Ensayos clínicos realizados con ciprofloxacina, en infecciones causadas por Gram-negativos, demostraron que un $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM}$ de 125 fue suficiente para optimizar la respuesta clínica. Estos valores son similares a los publicados para levofloxacina y grepafloxacina (Forrest *et al.*, 1993; Forrest *et al.*, 1997; Drusano *et al.*, 2004).

En tratamientos con fluoroquinolonas en general (incluida MFX), valores de $C_{\max}/\text{CIM} > 8 - 10$ y $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM} > 100$ o 125 se han relacionado con curación clínica y erradicación bacteriana, previniendo la selección de mutantes resistentes en microorganismos Gram-negativos (Lister, 2002; McKellar *et al.*, 2004; McKellar y Boggio, 2007; Papich, 2014; Cao *et al.*, 2015). Diversos autores defienden que el $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM}$ puede ser el indicador de eficacia más importante cuando la C_{\max}/CIM presenta una relación menor a 10:1 (Drusano *et al.*, 1993; Lister, 2002; Papich, 2014; Cao *et al.*, 2015).

Es importante tener en cuenta que la mayoría de los datos utilizados sobre parámetros de eficacia antimicrobiana provienen en su mayoría de estudios realizados en seres humanos gravemente enfermos y ratones con frecuencia neutropénicos o con algún grado de inmunosupresión. Como existen muy pocos estudios sobre indicadores de eficacia antimicrobiana en animales domésticos, la extrapolación de datos, en concreto la definición de puntos de corte, resulta un tanto conflictiva. Los valores usualmente aceptados de $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM} > 125$ son óptimos para pacientes gravemente enfermos o inmunodeprimidos, pero hay evidencias de que en algunos casos, valores de $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM}$ inferiores a este punto de corte son suficientes para lograr la curación de pacientes inmunocompetentes (McKellar *et al.*, 2004; McKellar y Boggio, 2007; Papich, 2014).

El valor óptimo de los parámetros de eficacia depende principalmente del patógeno en cuestión y del fármaco estudiado. Potter *et al.* (2013), en una modelización PK/PD de MFX para cepas aisladas de casos clínicos de bovinos con neumonía, consiguen una reducción de $4 \log_{10}$ en el recuento bacteriano de *Mannheimia haemolytica* con valor AUC_{0-24}/CIM de $68,0 \pm 32,6$ y de *Pasteurella multocida* con valor AUC_{0-24}/CIM $74,8 \pm 10,9$. Mientras que Cao *et al.* (2015) logran una reducción de $3 \log_{10}$ en el recuento bacteriano con un valor $AUC_{0-24}/CIM = 50,65$. Lhernie *et al.* (2015) observaron diferencias marcadas con respecto a la eficacia de la MFX frente a estas bacterias; incluso cuando las CIM de ambos microorganismos fueron muy similares.

Estudios clínicos e *in vitro* desarrollados con patógenos Gram-positivos, evidencian que los puntos de corte para el indicador de eficacia AUC_{0-24}/CIM que se relacionan con curación clínica y microbiológica, son en general menores que los recomendados para bacterias Gram-negativas. Wright *et al.* (2000), proponen un punto de corte AUC_{0-24}/CIM de 40 para *Streptococcus pneumoniae*. Modelos *in vitro* de levofloxacin y ciprofloxacina basados en la fracción de fármaco libre frente a *S. pneumoniae*, concluyen que valores de AUC_{0-24}/CIM de 32 y 64, respectivamente, se asocian con erradicación bacteriana (Lister y Sanders, 1999). Ambrose *et al.* (2001), comunicaron que valores de AUC_{0-24}/CIM de fármaco libre de 25 a 34, se asociaron a mayores tasas de supervivencia para gatifloxacina, gemifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y sitafloxacina. En este mismo estudio, valores de AUC_{0-24}/CIM de fármaco libre mayores a 33,7 se relacionaron con erradicación bacteriana. Del mismo modo, Xiao y Xiao (2008) lograron una disminución de $1 \log_{10}$ en el recuento bacteriano con valores de AUC_{0-24}/CIM de $65,7 \pm 30,6$ en un modelo de infección con *Staphylococcus aureus* en ratones neutropénicos tratados con antofloxacina.

El hecho de que los puntos de corte para el índice AUC_{0-24}/CIM sean menores cuando se trata de patógenos Gram-positivos, es de relevancia clínica, pues en general, las CIM de estas bacterias suelen ser más de diez veces superiores a las correspondientes Gram-negativas (*vide supra*). De modo que, en general, puntos de corte de AUC_{0-24}/CIM de 50 o incluso 30 suelen ser aceptados para alcanzar la erradicación bacteriana en infecciones causadas por bacterias Gram-positivas (Lister, 2002; Drusano, 2007; Papich, 2014).

Los índices C_{max}/CIM y AUC_{0-24}/CIM son los indicadores de eficacia clínica y microbiológica más representativos para fluoroquinolonas. Sin embargo, estos

indicadores podrían no ser los más adecuados para predecir la emergencia de mutantes resistentes en una población bacteriana. Por lo que si la emergencia de resistencia es uno de los puntos críticos a la hora de diseñar protocolos terapéuticos racionales para ATMs, es necesario contar con indicadores PK/PD que se relacionen con la prevención de la selección de mutantes resistentes.

Como expusimos anteriormente, la resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas surge principalmente como un proceso de dos pasos acumulables que involucran mutaciones cromosómicas puntuales en los genes que codifican las enzimas bacterianas diana de las fluoroquinolonas: la ADN-girasa y la topoisomerasa IV.

Mutaciones en la región *ParC* (topoisomerasa IV) y *GyrA* (ADN-girasa) causan un incremento en la CIM con una mutación y luego una resistencia completa con dos mutaciones (Varon *et al.*, 1999; Wetzstein, 2005; Homma *et al.*, 2007). Estas mutaciones aparecen al azar en una población bacteriana de forma previa a la exposición del ATM, y se asume que la tasa de mutación espontánea para mutantes de primer paso es de aproximadamente 10^{-9} a 10^{-7} . Cuando exponemos estas poblaciones a un ATM, las bacterias susceptibles mueren, mientras que los mutantes de primer paso pueden ser seleccionados y formar colonias resistentes (Ferran *et al.*, 2007). Del mismo modo que los índices C_{max}/CIM y AUC_{0-24}/CIM son utilizados para estimar la eficacia de diferentes regímenes posológicos de ATM, se han desarrollado otros parámetros PK/PD cuyo objetivo es la prevención de la amplificación de mutantes resistentes de primer paso. La mínima concentración a la cual son inhibidos los mutantes de primer paso se denomina concentración preventiva de mutantes (MPC, por “*mutant prevention concentration*”). Entendida como la concentración que inhibe el crecimiento de mutantes, a partir de un inóculo de 10^9 o 10^{10} UFC/ml (Mouton *et al.*, 2005; Wetzstein, 2005; Ferran *et al.*, 2007; Homma *et al.*, 2007; Canut Blasco *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2015).

Del mismo modo que la MIC indica la susceptibilidad del total de la población bacteriana, la MPC indica la susceptibilidad de los mutantes de primer paso (Ferran *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2015).

El intervalo de concentraciones entre la MIC y la MPC se denomina ventana de selección de mutantes o “*mutant selection window*” (MSW). La MSW se define como el rango de concentraciones donde pueden seleccionarse los mutantes de primer paso (Firsov *et al.*, 2003; Mouton *et al.*, 2005; Ferran *et al.*, 2007; Canut Blasco *et al.*, 2015;

Cao *et al.*, 2015). Dentro de este rango, la mayor parte de la población bacteriana susceptible es inhibida mientras que la subpoblación de mutantes resistentes es seleccionada, ya que las concentraciones del ATM son menores a la MPC del patógeno en cuestión. Estudios previos indican que el crecimiento de los mutantes de primer paso se inhibe cuando las concentraciones del ATM exceden la MPC por más del 80% del tiempo del intervalo de dosificación (o cuando el tiempo en que las concentraciones se encuentran en la MSW es menor al 20%). De modo que si las concentraciones del ATM se encuentran por encima de la MPC más del 80% del tiempo, las mutantes de primer paso que eventualmente puedan existir durante el tratamiento serán eliminadas, y no serán capaces de acumular mutaciones que puedan otorgarles resistencia completa. (Firsov *et al.*, 2003; Canut Blasco *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que cuanto mayor sea la MSW mayor será la probabilidad de selección de mutantes, la relación MPC_{90}/CIM_{90} es un indicador de dicha probabilidad, ya que cuanto mayor sea este cociente, mayor será la MSW. Por lo que deben seleccionarse los ATM con menor índice MPC_{90}/CIM_{90} .

Por otra parte, hay factores relacionados con el comportamiento farmacocinético que pueden influir en la probabilidad de selección de mutantes, ya que cuanto mayor sea el tiempo durante el cual las concentraciones del ATM se encuentran dentro de la MSW, mayor será la probabilidad de selección de mutantes de primer paso. Teniendo esto en cuenta, un régimen antibiótico debería alcanzar concentraciones por encima de la MPC y mantenerlas el tiempo suficiente para erradicar los mutantes de primer paso. Esto puede lograrse con antibióticos cuyas concentraciones permanezcan poco tiempo en la MSW tras la primera dosis y se mantengan por encima de la MPC tras dosis sucesivas, durante todo el tratamiento (Canut Blasco *et al.*, 2015). En la figura 6 se muestran gráficamente los conceptos de MPC y MSW.

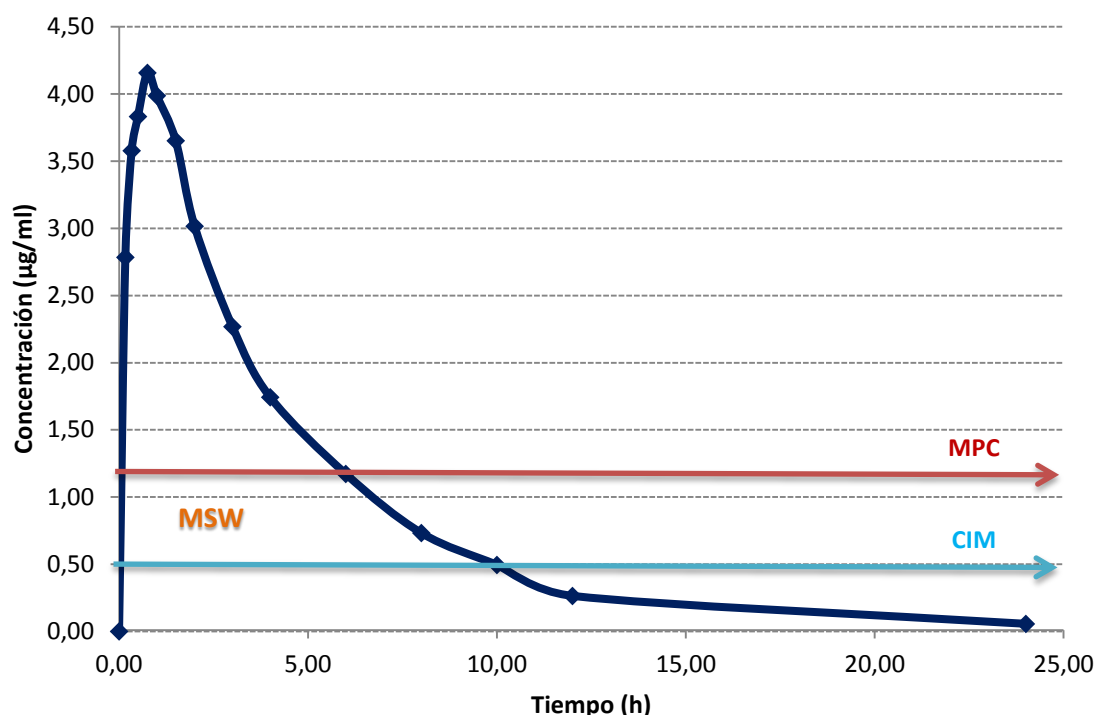


Figura 6: Esquemización de los conceptos de MPC y MSW a partir de la curva de concentración *versus* tiempo promedio de MFX tras la administración IM en cabras lactantes sanas realizado en esta tesis.

El tiempo en que las concentraciones se encuentran dentro de la MSW (T_{MSW}) es uno de los indicadores PK/PD relacionados a la prevención de la selección de mutantes, pero no es el único. La C_{max}/MPC y el AUC_{0-24}/MPC también han sido relacionados con la prevención de selección de mutantes resistentes (Firsov *et al.*, 2003; Blondeau *et al.*, 2004; Homma *et al.*, 2007; Ferran *et al.*, 2007; Vallé *et al.*, 2012; Köber-Irrgang *et al.*, 2012; Canut Blasco *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2015). La evidencia sugiere que los indicadores PK/PD basados en la MPC se correlacionarían mejor con la prevención de resistencia bacteriana que los basados en CIM. Homma *et al.* (2007) informaron que valores de $C_{max}/MPC > 1,20$ y $AUC_{0-24}/MPC > 13,41$ de fármaco libre, condujeron a la erradicación bacteriana y no se observó una disminución en la sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae*. Liang *et al.* (2011) destacaron este mismo hallazgo para levofloxacina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* con valores de $C_{max}/MPC > 2,20$ y $AUC_{0-24}/MPC > 25$ de fármaco libre. Körber-Irrgang *et al.* (2012) no detectaron modificaciones en la CIM de *Staphylococcus aureus* con valores para MFX de $C_{max}/MPC > 0,32$ y $AUC_{0-24}/MPC = 4,00$ de fármaco libre. Estos valores se correspondieron a C_{max}/MIC

y AUC_{0-24}/MIC de fármaco libre de 8,20 y 105. Por otra parte, Cao *et al.* (2015) reportó que la sensibilidad de *Pasteurella multocida* no se vió modificada con un $AUC_{0-24}/MPC \approx 13$, y Olofsson *et al.* (2007) para *E. coli*. proponen un valor $AUC_{0-24}/MPC = 22$.

A pesar de que aún queda mucho terreno para investigar y concretar, la información clínica disponible permite afirmar que se deben incorporar gran parte de los conceptos PK/PD de los antibióticos a la práctica médica. Y ello, no sólo por los posibles beneficios sobre los resultados clínicos directos, sino también por los riesgos de incrementar las resistencias mediante la utilización subóptima (valores de parámetros PK/PD por debajo de los objetivos demostrados en estudios experimentales y observacionales) de los antimicrobianos (Canut Blasco *et al.*, 2015).

1.6. IMPACTO DEL MODELO ANIMAL UTILIZADO SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE ANTIMICROBIANOS EN GLÁNDULA MAMARIA

Debido a que los ATMs son utilizados usualmente bajo condiciones de enfermedad, es lógico pensar que en mayor o menor medida, la presencia de inflamación e infección en el medio mamario podría modificar la biodisponibilidad de un ATM en animales con mastitis. Diferentes estudios analizan este efecto, destacamos los realizados por Litterio *et al.* (2007) con tilosina o por Lucas *et al.* (2010) con azitromicina, ambos en la especie bovina; y el estudio de Singh *et al.* (2010) con gatifloxacina, en cabras lactantes sanas y con mastitis clínica inducida por *S. aureus*.

Singh *et al.* (2010) observan como gatifloxacina presenta mayor biodisponibilidad láctea en cabras con mastitis clínica que en animales clínicamente sanos (mayor C_{max} , ABC_{leche} , $t_{1/2\lambda leche}$ y TMR_{leche}). Los niveles son detectados en leche durante 24 horas en animales sanos y durante 48 horas en cabras con mastitis clínica. Los autores, interpretan que este hecho podría deberse a múltiples causas. En general, la sangre posee un pH relativamente constante, mientras que en la leche el pH es variable, en especial cuando ocurre un proceso inflamatorio en la glándula mamaria, en el que el pH puede aumentar con respecto a los valores normales. En estas condiciones, gatifloxacina sufriría un fenómeno de trampa iónica en la leche de cabra con mastitis, lo que aumentaría su biodisponibilidad láctea. Además, otros factores podrían tener influencia, como por ejemplo el incremento en la permeabilidad de los capilares endoteliales y las células epiteliales de los acinos glandulares observado en los procesos inflamatorios, y

desencadenado por la liberación de mediadores químicos de la inflamación en la zona afectada, podría llegar a incrementar la difusión de gatifloxacina a leche. Por otra parte, es conocido que las fluoroquinolonas tienden a acumularse en células tales como los polimorfonucleares (PMN). Debido a que la migración de PMN se ve incrementada durante la mastitis clínica en cabras, la acumulación intracelular de gatifloxacina en PMN podría ser otro factor que ayude a explicar la mayor biodisponibilidad láctea observada en animales enfermos.

Verma y Roy (2006), estudiaron la biodisponibilidad láctea de gatifloxacina en cabras sanas y con fiebre inducida mediante la inoculación endovenosa de un lipopolisacárido extraído de una cepa de *E. coli*. Gatifloxacina presentó una menor difusión a leche en animales sanos que en enfermos, y permaneció más tiempo en leche en los individuos sanos. Lo que se reflejó en una mayor $t_{1/2\lambda_{leche}}$ y un mayor TMR_{leche} . En cabras febriles, gatifloxacina difundió en mayor medida a la glándula mamaria y fue eliminada de leche más rápidamente. Entendiendo que esto podría deberse a que el proceso inflamatorio incrementa la perfusión y la permeabilidad capilar en la glándula mamaria.

Estos trabajos destacan la importancia de utilizar modelos de estudio lo más parecidos posible a las condiciones clínicas en las cuales el ATM será utilizado.

II. Justificación y objetivos

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La cabra es una especie rústica que se adapta a zonas áridas y/o montañosas y cuyo destino, fundamentalmente, es la producción de carne y piel. En países como Argentina, en aquellas regiones donde no es posible la cría del tradicional bovino, la cabra resulta ser una interesante alternativa productiva. Incluso desde algunos sectores gubernamentales se incentiva la producción de leche, para fomentar las economías regionales (MAGyP, 2006). En general, los tambos caprinos de dichas zonas (establecimientos destinados al ordeño, producción y venta de leche cruda), presentan características de empresa familiar, con un manejo extensivo y majadas de pocos animales en producción. Estos establecimientos presentan una alta dependencia forrajera natural, lo cual hace difícil mantener a lo largo del año una eficiencia productiva constante y acorde a las necesidades del mercado.

Por otra parte, la intensificación productiva de los tambos caprinos conlleva a un aumento en la incidencia de enfermedades parasitarias e infecciosas, las cuales van en detrimento del bienestar animal y la productividad del hato. Por tal motivo es necesario realizar un adecuado manejo de estas patologías.

Entre las enfermedades infecciosas más frecuentes en las explotaciones lecheras caprinas se encuentra la mastitis, que muestra una incidencia variable de acuerdo a las condiciones nutricionales, sanitarias y de manejo de cada explotación. Supone un problema sanitario importante para los tambos caprinos, ya que afecta la calidad y seguridad de la leche, pudiendo generar grandes pérdidas económicas al productor e incluso poniendo en riesgo la salud pública.

La mastitis subclínica suele ser la más frecuente, con una incidencia que puede superar en algunos casos el 30%. Siendo los estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Staphylococcus aureus* y estreptococos los principales microorganismos involucrados (Bergonier *et al.*, 2003).

La mastitis clínica en cabras presenta, en general, una menor morbilidad (inferior al 5%), salvo en casos de brotes epidémicos, en los que la prevalencia puede ascender al 50%. A menudo pueden provocar alteraciones permanentes en la glándula mamaria o bien la pérdida de la misma. En algunos casos (18%) la infección intramamaria es tan grave que causa la muerte de los animales o bien impone su sacrificio (principalmente en los dos/tres primeros meses de lactación). Los agentes etiológicos más comunes en

procesos clínicos suelen ser *S. aureus*, estreptococos, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens* y el virus de la artritis encefalitis caprina (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007).

Un aspecto esencial a considerar en el control de la mastitis es la correcta utilización de medicamentos antimicrobianos (ATMs). El tratamiento con estos agentes se realiza para recuperar a los animales infectados, eliminar focos infecciosos y aminorar las pérdidas productivas a futuro.

Debido a que muchas veces no existen estudios que determinen el esquema terapéutico en cada especie, un error usual en la práctica clínica es realizar extrapolaciones posológicas de una especie a otra similar, como por ejemplo de bovinos u ovinos a caprinos. Cada una de estas especies presenta características diferenciales que condicionan el comportamiento cinético del fármaco, su absorción, distribución, metabolismo y excreción; las cuales pueden modificar por ejemplo la biodisponibilidad de los ATMs en el organismo animal. Por lo que es necesario realizar estudios farmacocinéticos en cada especie, que permitan el diseño de esquemas posológicos que garanticen eficacia (clínica y bacteriológica) y seguridad (para el paciente, la población animal, la salud pública y la salud medioambiental). Esto evitaría consecuencias derivadas del mal uso de los ATMs (uso no racional y/o uso no prudente), tales como el fracaso terapéutico, los problemas iatrogénicos, la facilitación de emergencia de resistencias bacterianas, la presencia de residuos medicamentosos en alimentos de origen animal y productos derivados, o su impacto sobre la salud pública o la salud medioambiental (Boerlin y White, 2006; San Andrés y Boggio, 2007; Plachouras *et al.*, 2014; Doorslaer *et al.*, 2014).

Entre los factores que pueden incidir sobre la biodisponibilidad de los ATMs en la glándula mamaria caprina, destacamos sus características anatomo-fisiológicas específicas, las características inherentes al fármaco, el volumen de leche producido por el individuo y la frecuencia de ordeño (Gehring *et al.*, 2006; San Andrés y Boggio, 2007). La ausencia/presencia de mastitis también puede influir sobre su biodisponibilidad, por lo que resultan de gran interés los estudios de farmacocinética desarrollados en animales con patologías mamarias. La escasa información disponible en la bibliografía, al inicio del proyecto, acerca de la importancia e influencia de cada uno de estos factores

en la especie caprina, nos llevó a incluirlos como parte de nuestro estudio de biodisponibilidad de ATMs en la leche de cabra.

La marbofloxacin (MFX) es una fluoroquinolona de tercera generación, desarrollada para uso exclusivo en medicina veterinaria. Como otros miembros de esta familia, está indicada para el tratamiento de infecciones en diversos sistemas, incluida la glándula mamaria. Aunque existen estudios del comportamiento farmacocinético de la MFX en varias especies de rumiantes e incluso en caprinos (Waxman *et al.*, 2001; Bousquet-Melou *et al.*, 2002; Waxman *et al.*, 2004; Ismail y Kattan, 2007; Papich y Riviere, 2009), la información referente a su biodisponibilidad láctea en cabras es muy escasa; en las fases de investigación bibliográfica únicamente hemos encontrado un estudio, de Fernández-Palacios (2013).

La MFX, es un antimicrobiano clasificado como concentración dependiente que presenta efecto post-antibiótico y posee un efecto bactericida rápido frente a los microorganismos susceptibles; una característica que hoy en día cobra cada vez más importancia desde el punto de vista clínico, principalmente cuando se tratan pacientes críticamente enfermos o que poseen un sistema inmunológico deprimido. Desarrolla su efecto bactericida actuando sobre la síntesis del ADN bacteriano, ocasionando daños que conducen a defectos en el superenrollamiento negativo, mediante inhibición de dos enzimas involucradas: la ADN-girasa y la topoisomerasa IV (Appelbaum y Hunter, 2000; USP, 2007; Bolon, 2011; Guiguère y Dowling, 2013).

La MFX está indicada para el tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, digestivas, piodermias, otitis, infecciones de tejidos blandos y del aparato reproductor (endometritis, piómetra, mastitis, entre otras) (EMA, 2000; Meunier *et al.*, 2004; Agencia Española del Medicamento, 2009; Guiguère y Dowling, 2013; Kroemer *et al.*, 2014).

Entre los criterios de selección de un ATM, es importante considerar no sólo la sensibilidad *in vitro* de un cultivo bacteriano, sino también el comportamiento *in vivo* del agente quimioterapéutico. De su integración surge el concepto de modelización y simulación farmacocinética/farmacodinámica (simbolizados por las siglas en inglés PK/PD) de la que se obtienen datos cuantitativos (parámetros o índices PK/PD) que son empleados para el diseño de posologías que permitan maximizar el éxito terapéutico y

minimizar la emergencia de resistencia bacteriana (Mouton *et al.*, 2002; Toutain *et al.*, 2002; McKellar *et al.*, 2004; Blasco *et al.*, 2013; Papich, 2014; Kitamura *et al.*, 2014).

El uso racional de ATMs, minimiza el riesgo de emergencia de resistencias, pero no lo evita, ya que todo ser vivo tiende a adaptarse al ambiente que lo rodea, principalmente mediante mutación genética y selección natural. Existe evidencia del impacto que tienen los residuos originados por el uso de ATMs sobre el medioambiente y los ecosistemas. Es necesario evitar la presión terapéutica y hacer un uso prudente de los ATMs, entendidos como un bien social.

El **objetivo general** del presente estudio es aportar evidencias que respalden la necesidad de avanzar hacia un uso racional y prudente de los ATM en las especies veterinarias. A tal efecto, nos propusimos ensayar una herramienta predictiva que facilite la definición de programas de manejo terapéutico de la mastitis caprina, con garantía de eficacia y seguridad en nuestra región.

Para su consecución, definimos los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM₅₀, CIM₉₀ y CIM₉₉) de cepas de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos regionales, procedentes de mastitis subclínicas caprinas, en hatos de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Describir y analizar el comportamiento cinético de la marbofloxacina, a partir de muestras séricas, y su biodisponibilidad en leche; tras ser administrada a dosis única, por vía intravenosa e intramuscular, en cabras sanas.
- Calcular los indicadores de eficacia antimicrobiana C_{max}/CIM y $AUC_{(0-t)}/CIM$, a partir de la integración de los datos obtenidos del análisis farmacocinético, a dosis única en cabras sanas, y los parámetros de sensibilidad antimicrobiana de los patógenos regionales.
- Proponer un esquema posológico multidosis por vía intramuscular, basado en el análisis de los indicadores de eficacia antimicrobiana C_{max}/CIM y $AUC_{(0-t)}/CIM$.
- Evaluar el comportamiento cinético de la marbofloxacina, a partir de muestras séricas, y su biodisponibilidad en leche; tras la administración intramuscular, de un régimen dosis múltiple, en cabras con mastitis subclínica.

- Evaluar la eficacia terapéutica del esquema posológico multidosis ensayado en cabras con mastitis subclínica, mediante el análisis de la integración de datos PK/PD. Empleando los indicadores de eficacia (C_{\max}/CIM y $AUC_{(0-t)}/CIM$) y de prevención de selección de mutantes (C_{\max}/MPC_{90} , $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ y T_{MSW}), y la evidencia de ausencia de infección resultante de los cultivos bacterianos de la leche.
- Evaluar la evolución temporal de la producción de leche y el pH lácteo en los medios mamarios sanos e infectados, a lo largo del tratamiento con marbofloxacin.

Hipótesis: Es posible predecir y evaluar la eficacia potencial (clínica y bacteriológica) de un esquema terapéutico de dosis múltiples de marbofloxacin, en cabras mastíticas; mediante la evaluación de los datos derivados de un análisis que integre parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin, obtenidos en nuestras cabras autóctonas, con datos propios de sensibilidad obtenidos con cepas microbiológicas loco-regionales.

III . Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

La descripción del material está relacionada con las diferentes etapas de este trabajo, por lo tanto se describen las unidades experimentales utilizadas en el ensayo con MFX a dosis única y dosis múltiple, los fármacos y los materiales empleados tanto en los muestreos como en el análisis en laboratorio. Con el mismo criterio se mencionan los equipos, teniendo en cuenta las técnicas analíticas empleadas.

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO EN LOS ENSAYOS DE DOSIS ÚNICA Y DOSIS MÚLTIPLE

El estudio farmacocinético de dosis única de MFX, administrada por vía IM, se llevó a cabo con seis cabras adultas clínicamente sanas, de raza Anglo Nubian, pertenecientes al Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en la Universidad Católica de Córdoba. Los animales presentaron una condición corporal tres sobre cinco (3/5). Todas las cabras se encontraban en etapa de lactación y no grávidas. Los pesos oscilaron entre 32 y 47 kilos, y la edad entre 3 y 5 años (tabla 14, sección resultados).

Las unidades experimentales utilizadas para la realización del estudio farmacocinético de un régimen de dosis múltiple de MFX, administrada por vía IM, fueron siete cabras adultas con mastitis subclínica, de raza Anglo Nubian, pertenecientes al Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Católica de Córdoba. Los animales presentaron una condición corporal 3/5. Ningún animal se encontraba gestando y todos estaban en etapa de lactación. Los pesos oscilaron entre 30 y 46 kg, y la edad entre 3 y 6 años (tablas 15 y 16, sección resultados).

3.1.2. MATERIAL FUNGIBLE

3.1.2.1. ESTUDIO DE CAMPO

Los materiales empleados en las tomas de muestras y transporte hacia el laboratorio fueron los siguientes:

- Agujas hipodérmicas estériles descartables (25/8 y 40/12)
- Alcohol 70° (Porta)
- Alcohol 90° (Porta)
- Algodón hidrófilo

- Botellas plásticas (500 y 1500 ml) descartables con tapa a rosca.
- Cajas isotérmicas de poliestireno expandido y geles refrigerantes
- Gradillas
- Guantes de látex descartables
- Iodo povidona 10% (Pervinox)
- Jeringas descartables, estériles (2,5, 5, 10 y 20 ml) (AB)
- Planillas para la toma de muestra
- Reactivo azidiol para conservación de células somáticas en leche
- Toallas de papel
- Tubos de 15 y 40 ml con tapa a rosca, estériles
- Tubos de centrífuga descartables con tapas, identificados
- Tubos eppendorf de 2 ml

3.1.2.2. MATERIALES UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

Las técnicas que posteriormente se detallan, emplearon principios físico-químicos y microbiológicos. El material común fue:

- Gradillas
- Guantes de látex descartables
- Material de vidrio: probetas, pipetas, volpipetas, tubos de ensayo, vasos de precipitado, erlenmeyers, kitsato y embudos
- Puntas para micropipeta de 200 y 1000 μ l

A su vez, para la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography o HPLC) se empleó:

- Acetonitrilo calidad HPLC (LICHrosolv®, Merck)
- Ácido acético glacial para análisis instrumental (Panreac Química S.A.)
- Ácido fórmico 99% RPE – ACS (Analyticals)
- Ácido fosfórico 99,99 % 85 w % solución en agua (Sigma - Aldrich)
- Agua bidestilada calidad HPLC (Millipore Simplicity®)
- Cloroformo grado reactivo ACS
- Helio (Alphagas, Air Liquide España S.A.)
- Hidrogenofosfato de amonio 99,99% (Sigma - Aldrich)

- Insertos de fondo plano (200 µL, FB micro-serts Nacional Scientific)
- Metanol calidad HPLC (Scharlau Chemie S.A.)
- Nitrógeno (Alphagas, Air Liquide España S.A.)
- Septos de teflón 8 mm (Nacional Scientific)
- Tetrabutilamonio bisulfato (Fluka)
- Trietilamina (Sigma Chemical CO)

Por último, el material utilizado en las técnicas microbiológicas fue:

- Agar Mueller-Hinton (Biokar)
- Ansas calibradas de 50 µl
- Caldo cerebro corazón (Biokar)
- Caldo triptéina de soja (Difco)
- Microorganismos de referencia: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
- Placas de Petri de 90 mm de diámetro (Deltalab)
- Sacabocados de 5 mm de diámetro

3.1.3. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Para la realización de los ensayos en animales, se empleó una formulación comercial de MFX, en solución inyectable al 10 % p/v (Marbocyl® 10%, Laboratorio Vétoquinol; Francia; lote: 6A0302B).

Para la confección de los estándares para la cuantificación de los niveles de MFX en suero y leche, se utilizó sustancia patrón de referencia (MFX pura) suministrada por el laboratorio de especialidades veterinarias Vetoquinol (Lure, Francia), lote 111739. Además, se utilizó ofloxacina pura como patrón interno de la técnica cromatográfica, la cual fue suministrada por Sigma Chemical CO, lote 038K1555.

3.1.4. EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN

El equipamiento general utilizado ha sido:

- Agitador horizontal de tubos (IKA VIBRAX VXR)
- Agitador magnético (Agimatic E)
- Agitador vortex (CKTech VI - 2)
- Balanza digital para los animales (20g - 200 kg) (BalanCor)
- Balanza de precisión (Mettler AE-160)
- Baño maría (B.A. BUNSEN)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen Universal 32 R)
- Congelador (Hettich freezer – 80°C)
- Medidor de pH (MicroPH 2001, Crison)
- Micropipetas automáticas de volumen variable: 20 a 200 µl y 200 - 1000 µl (Pipetman, Gilson, Socorex)
- Purificador de agua (Millipore Simplicity®)
- Rasuradora (Oster Golden A5. 5-55H)
- Neveras y refrigeradores (Lieber pentium frost-free)
- Reloj digital

El equipo HPLC y sus componentes ha sido el siguiente:

- Cromatógrafo: Thermo separation Products
- Bomba (Spectra series P100)
- Inyector automático (Spectra SERIES AS- 1000)
- Precolumna del cromatógrafo: Kromasil C18 5U 15 x 4,6 mm (Scharlab S.L.)
- Fase estacionaria: Columna Kromasil 100 C18 5 µm 15 x 0,46 cm (Scharlab S.L.)
- Detector ultravioleta (Spectra series UV 100)
- Datajet integrator

Los equipos empleados para las técnicas microbiológicas fueron:

- Aparato Multi-inoculador bacteriano de Steers-Foltz
- Autoclave VZ100 tipo Chamberland
- Bomba de vacío (Vacío Pont)
- Calibre digital de 0 a 150 mm
- Densitómetro (Densimat, BioMérieux)
- Estufa de cultivo (Faeta)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. SELECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES

3.2.1.1. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA EN ANIMALES SANOS

Durante la realización de la experiencia, los animales recibieron heno de alfalfa y suplementación a base de alimento concentrado, además de tener acceso *ad libitum* al agua de bebida. Los cabritos en período de lactancia fueron separados de sus madres durante la realización del estudio, y se les ofreció leche procedente de madres en lactación que no participaron en el mismo.

Antes de realizar las experiencias y durante el desarrollo de las mismas, se cuantificó la producción láctea diaria de cada animal correspondiente a dos ordeños diarios. Ninguno de los animales que participaron en el estudio recibió medicación farmacológica, durante los dos meses previos al estudio. Inmediatamente antes y durante el ensayo, se realizaron medidas de pH en las muestras de leche obtenidas de cada ordeño.

En todos los animales se inspeccionaron ambos medios mamarios y las características macroscópicas de la leche, con objeto de descartar presencia de sangre, flóculos y otras alteraciones compatibles con mastitis clínica.

Para constatar la ausencia de mastitis subclínica, se tomaron muestras de leche para análisis microbiológico y recuento de células somáticas (RCS). De acuerdo a Sherarer y Harris (2003) se consideró como una glándula sana aquella cuya leche poseía un RCS menor a un millón de células/ml y ausencia de aislamiento bacteriano.

Las muestras para evaluación microbiológica fueron tomadas conforme a métodos asepticos, recomendados por el National Mastitis Council (Oliver *et al*, 2004). Para ello,

se utilizaron tubos estériles de plástico con tapa a rosca. En primer lugar se desinfectó cada pezón con un algodón embebido en alcohol al 70% y se secaron con toallas de papel individuales, para evitar la contaminación cruzada. Se desecharon los 3 primeros chorros de leche para eliminar patógenos que hubieran colonizado el canal del pezón, y se procedió a recolectar de 5 a 15 ml de leche, teniendo cuidado de que ni los dedos del operador ni la ubre tocaran el borde del tubo. Una vez tapado el tubo estéril, se procedió a su congelación a -20°C hasta su posterior procesamiento. El análisis microbiológico se realizó en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Rafaela, provincia de Santa Fe, Argentina).

Paralelamente, se recolectaron muestras de leche en tubos no estériles para RCS, con objeto de determinar, junto con los resultados del análisis microbiológico, la presencia/ausencia de mastitis subclínica en los animales utilizados en el estudio. Se recolectaron aproximadamente 40 ml de leche de cada medio mamario y se colocaron en frascos con tapa hermética debidamente identificados, con azidiol (0,15 ml cada 50 ml de leche) que actuaba como conservante y evitaba la aglutinación de las células somáticas presentes en la leche. Las muestras, conservadas a 4°C con azidiol, se remitieron a la Escuela Superior Integral de Lechería (Villa María, provincia de Córdoba) en un plazo menor a las 6 horas posteriores a su recolección. Allí se les realizó el RCS con un equipo electrónico Fossomatic 5000, de acuerdo a la metodología estandarizada (IDF, 1995).

3.2.1.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE EN ANIMALES ENFERMOS

El proceso de selección de animales con mastitis subclínica fue llevado a cabo siguiendo un protocolo de inclusión, conforme a las recomendaciones de Sherarer y Harris (2003). Inicialmente se realizó un examen físico de ambos medios mamaros de cada animal, así como de las características macroscópicas de la leche, con objeto de identificar aquellos animales con mastitis clínica y no incluirlos en el estudio. Paralelamente, la leche de cada medio mamario fue analizada mediante el test de aglutinación para mastitis de California (California mastitis test, CMT). Los individuos con resultados al $\text{CMT} \geq 2$, fueron preseleccionados. Posteriormente se tomaron muestras de leche procedentes de cada medio mamario sospechoso de mastitis subclínica, para

cultivo microbiológico (en tubos estériles) y RCS (en tubos con azidíol), con los mismos procedimientos que los descritos en los animales empleados en los ensayos a dosis única. De entre los animales que resultaron positivos al diagnóstico de mastitis subclínica, se seleccionaron aquellos que presentaron sólo un medio mamario infectado con ECN. Destacamos esta característica (sólo un medio mamario afectado), debido a que el medio restante (sano) fue utilizado como control.

Antes de realizar las experiencias y durante el desarrollo de las mismas, se cuantificó la producción láctea diaria de cada animal correspondiente a dos ordeños diarios. Ninguno de los animales que participaron en el estudio recibió medicación farmacológica alguna, durante los dos meses previos al estudio. Antes y durante la realización del ensayo, se realizaron medidas de pH de las muestras de leche obtenidas de cada ordeño.

3.2.2. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y TOMA DE MUESTRAS

Nuestro estudio se dividió en dos etapas experimentales, correspondiendo la primera a la administración de MFX en dosis única por vía intravenosa (IV) e intramuscular (IM) en animales sanos, y la segunda a la administración del antimicrobiano en un esquema de administración IM multidosis, en cabras con mastitis subclínica en uno de sus medios mamarios. Las mismas se describen a continuación.

3.2.2.1. ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA DE MARBOFLOXACINA, EN ANIMALES SANOS

Se ensayaron dos vías de administración (IV e IM), a fin de minimizar la variación individual sobre los tratamientos, el estudio fue llevado a cabo aplicando un diseño experimental cruzado. Para ello se realizaron dos experiencias separadas por un período de lavado de dos semanas entre cada una. En cada ensayo, los dos tratamientos se asignaron al azar a grupos de tres animales de manera que, una vez desarrolladas ambas experiencias, todos los animales recibieran los dos tratamientos.

El día del ensayo, se pesaron los animales para poder calcular la dosis de fármaco a administrar. Se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular derecha, y una muestra de leche de ambos medios mamarios, para comprobar la ausencia de MFX en el suero y la leche de los animales (muestra cero). Finalmente y antes de administrar el

fármaco, se vaciaron ambos medios mamarios, se registró el volumen extraído y el pH lácteo (este procedimiento se repitió cada 12 horas, durante las 48 horas que duró la experiencia). En cada ensayo se administró MFX a una dosis de 5 mg/kg; a tres animales por vía IV (vena yugular izquierda), y los otros tres por vía IM (entre los músculos semitendinoso y semimembranoso en el tercio medio del muslo izquierdo).

Tras la administración IV de MFX, se extrajeron muestras de sangre (vena yugular derecha) a los 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos y a las 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas. Mientras que tras la administración IM de MFX, las muestras de sangre fueron extraídas a los 10, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos y a las 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas.

La sangre fue almacenada en tubos de 15 ml con tapa, previamente identificados. Los mismos fueron colocados en gradillas y éstas a su vez, dentro de cajas isotérmicas con geles refrigerantes, hasta el momento de extraer el suero. Las muestras fueron identificadas con un código alfanumérico, designando a cada animal con las siglas “IV” o “IM” (de acuerdo a la vía de administración) seguida del número de identificación (1 – 6) correspondiente a cada animal (tabla 14), y un subíndice numerado, correspondiente al número de muestra que se indicaba en la planilla de extracción.

Tras la administración IM o IV de MFX, se tomaron muestras de leche a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas, mediante ordeño manual, previa desinfección de pezones con alcohol al 70%. Cada muestra se constituyó por la mezcla de leche de ambos medios mamarios (aproximadamente 10 ml) y fue colocada en tubos con tapa rosca correctamente identificados. Todas las muestras de leche fueron refrigeradas (4°C) durante un periodo de 2-4 h, transcurrido el cuál se almacenaron en congelación (-20°C) hasta el momento de su análisis. La identificación de las muestras de leche siguió el mismo sistema alfanumérico descrito para las muestras de sangre.

Para garantizar el cumplimiento de los tiempos se utilizaron planillas de extracción, en donde se anotaron los tiempos reales de extracción de cada muestra (suero y leche) para cada animal. Esta tarea estuvo a cargo de un planillero, que además de registrar los tiempos reales de toma de muestras indicaba los momentos de extracción.

La realización de las experiencias, la extracción de suero de las muestras de sangre y el acondicionamiento de las muestras de suero y leche, se llevaron a cabo en el laboratorio

de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), Argentina.

Para facilitar la obtención del suero, cada tubo con la muestra de sangre se colocó en baño térmico a 38°C durante 45 minutos, con objeto de favorecer la retracción del coágulo. Seguidamente se centrifugó a 3600 rpm durante 10 minutos, se separó el suero sobrenadante con ayuda de una pipeta, y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml, manteniendo su código de identificación original. Los tubos correspondientes a cada grupo de animales se acomodaron dentro de una gradilla con tapa para tubos eppendorf, rotulada para garantizar su identificación, y fueron refrigeradas (4°C) durante un periodo de 2 a 4 horas, transcurrido el cuál se congelaron a -20°C.

Todas las muestras (suero y leche) fueron transportadas vía aérea, en contenedores isotérmicos con geles refrigerantes, custodiadas y con los permisos de los organismos de control para el transporte de material biológico correspondientes (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria; SENASA), desde la UCC hasta el laboratorio del Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria (FV) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), donde procedimos a realizar la cuantificación de MFX.

3.2.2.2. ESTUDIO DE DOSIS MÚLTIPLES DE MARBOFLOXACINA, EN ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA

El estudio del comportamiento farmacocinético de un régimen de dosis múltiple con MFX, se realizó en siete cabras con mastitis subclínica únicamente en uno de sus medios mamarios, de modo que el otro medio mamario sano actuaba como control. El día del ensayo los animales fueron pesados a los fines de calcular el volumen de solución de MFX a administrar, en función de la dosis. Previo al inicio de la experiencia se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular derecha y una muestra de leche de cada medio mamario, con el fin de comprobar la ausencia del ATM en el suero y en la leche de los animales (muestra cero). Del mismo modo, cada 24 horas durante los 7 días que duró la experiencia y siempre antes del vaciado de la ubre, se tomaron de cada medio mamario muestras de leche para cultivo microbiológico; la toma se realizó de forma aséptica, como describimos anteriormente. Posteriormente se procedió al ordeño manual de cada medio, previa desinfección con alcohol al 70%, y se tomó registro de sus

producciones y pH lácteos, cada 12 horas, durante todo el desarrollo de la experiencia (tabla 16).

Para la realización del ensayo se administró, durante 5 días consecutivos, 10 mg/kg de MFX cada 24 horas, por vía IM, entre los músculos semitendinoso y semimembranoso del tercio medio del muslo. El sitio de administración fue alternando entre el muslo izquierdo y el derecho en las sucesivas administraciones a lo largo del tratamiento, por razones de bienestar animal, y por una potencial toxicidad tisular en el sitio de administración (descrita en la bibliografía) que podría afectar a la biodisponibilidad del ATM. La dosis utilizada de MFX (10 mg/kg), fue determinada a partir del cálculo de indicadores de eficacia utilizando un modelo de simulación basado en los datos farmacocinéticos obtenidos tras la administración a dosis única. El procedimiento se describe en el apartado cálculo de dosis múltiple, de esta memoria.

Una vez administrada la MFX, se tomaron muestras de sangre a tiempos prefijados como se muestra en la tabla 13. La sangre fue almacenada en tubos de 15 ml con tapa, correctamente identificados. Para la identificación de las muestras del estudio farmacocinético a dosis múltiple por vía IM, se utilizó un sistema de identificación alfanumérico, asignándole a cada animal el número de identificación correspondiente (tabla 15), y un subíndice numerado, correspondiente al número de muestra que se indicaba en la planilla de extracción. Los tubos, debidamente identificados, fueron colocados en gradillas y éstas a su vez, dentro de cajas isotérmicas con geles refrigerantes, hasta el momento de extraer el suero.

Paralelamente, las muestras de leche de cada medio mamario, se tomaron muestras de sangre a tiempos prefijados como se muestra en la tabla 13. Cada muestra se constituyó por una alícuota de leche de 10 ml proveniente de cada medio mamario por separado, la cual fue almacenada en tubos con tapa rosca de debidamente identificados. El sistema de identificación utilizado para las muestras de leche fue el mismo que el descrito para las de suero de la dosis múltiple. Todas las muestras de leche se refrigeraron durante 2 – 4 horas (4°C) y luego se congelaron (-20 °C) hasta el momento de su análisis.

Para garantizar el cumplimiento de los tiempos se utilizaron planillas de extracción, en las que se anotaron los tiempos reales de extracción de cada muestra (suero y leche)

para cada animal. Esta tarea estuvo a cargo de un planillero, que además de registrar los tiempos reales de toma de muestras indicaba los momentos de extracción.

Tabla 13: esquema de toma de administración de MFX, vaciado de glándula, muestreo microbiológico, y tomas de muestra de suero y leche; del estudio farmacocinético de marbofloxacin post administración de dosis múltiple vía intramuscular, en cabras con mastitis subclínica.

Día	Tiempo	Administración MFX	Vaciado glándula	Microbiología	Muestra suero	Muestra leche
1	0,00	X	X	X	X	X
	0,17				X	
	0,33				X	
	0,50				X	
	0,75				X	
	1,00				X	X
	1,50				X	
	2,00				X	X
	4,00				X	X
	6,00				X	X
	8,00				X	X
	10,00				X	X
	12,00				X	X
	24,00	X	X	X	X	X
2	24,50				X	
	24,75				X	
	25,00				X	X
	26,00				X	X
	36,00				X	X
	48,00	X	X	X	X	X
3	48,17				X	
	48,33				X	
	48,50				X	
	48,75				X	
	49,00				X	X
	49,50				X	
	50,00				X	X
	52,00				X	X
	54,00				X	X
	56,00				X	X
	58,00				X	X
	60,00				X	X
	72,00	X	X	X	X	X

Tabla 13 (continuación): esquema de toma de administración de MFX, vaciado de glándula, muestreo microbiológico, tomas de muestra de suero y leche del estudio farmacocinético de marbofloxacin a dosis múltiple por vía intramuscular en cabras con mastitis subclínica.

Día	Tiempo	Administración MFX	Vaciado glándula	Microbiología	Muestra suero	Muestra leche
4	72,50				X	
	72,75				X	
	73,00				X	X
	74,00				X	X
	84,00				X	X
	96,00	X	X	X	X	X
5	96,17				X	
	96,33				X	
	96,50				X	
	96,75				X	
	97,00				X	X
	97,50				X	
	98,00				X	X
	100,00				X	X
	102,00				X	X
	104,00				X	X
	106,00				X	X
	108,00				X	X
	120,00	X	X	X	X	X
6	132,00				X	X
	144,00	X	X	X	X	X
7	168,00		X	X		

La extracción de suero a partir de las muestras de sangre, y el acondicionamiento de las muestras de suero y leche, se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacología y Toxicología de la FCA - UCC, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos en el ensayo a dosis única. La cuantificación de la MFX se realizó en este mismo laboratorio.

3.2.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MARBOFLOXACINA, EN SUERO Y LECHE

Como se comentó previamente, la cuantificación de MFX en las muestras de suero y de leche, se llevó a cabo en dos laboratorios: en el correspondiente al Dpto. de Toxicología y Farmacología FV – UCM (Madrid, España), y en el de Farmacología y Toxicología de la FCA – UCC (Córdoba, Argentina). En el primero de ellos se analizaron las muestras del estudio farmacocinético de dosis únicas, realizado en animales sanos,

mediante la técnica descrita por Waxman *et al.* (2001), que emplea cromatografía líquida de alta precisión con detector ultravioleta (HPLC/uv). Mientras que en el laboratorio de la UCC, se realizaron los análisis de las muestras del estudio farmacocinético de un régimen de dosis múltiple, desarrollado en cabras con mastitis subclínica. Dicho análisis se realizó mediante una adaptación de la técnica microbiológica de difusión en agar descrita inicialmente por Bennett *et al.* (1966).

3.2.3.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/uv)

La metodología para la detección de MFX fue la cromatografía líquida de alta eficacia descrita previamente por Waxman *et al.* (2001). Esta técnica es una modificación de la descrita por Schneider *et al.* (1996) y por Cester *et al.* (1996). Previamente a la puesta a punto del método se realizó un análisis del espectro de absorción de la marbofloxacin, con una muestra de 1 µg/ml, en ácido fórmico 0,10 N, para determinar la longitud de onda a seleccionar. La misma resultó ser de 295 nm.

La determinación de la cantidad de MFX en las muestras se realizó por interpolación en una recta de calibración, generada a partir de una batería de soluciones estándares de MFX a concentración creciente conocida. Para el cálculo de la recta de calibración, se realizó una regresión entre los datos de áreas bajo la curva, obtenidas de la lectura cromatográfica de las soluciones estándares, frente a las concentraciones de dichas soluciones. Una vez calculada la recta de calibración, se utilizó la ecuación de regresión obtenida para transformar las áreas bajo la curva de las muestras, en concentraciones de MFX.

3.2.3.1.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las muestras y estándares fueron analizadas bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna: Kromasil 100 C18 5 µm 15 x 0,46.
- Precolumna: Kromasil C18 5U tamaño 15 x 4,60 mm.
- Longitud de onda del detector uv: 295 nm.
- Volumen de inyección: 20 µl.
- Flujo de fase móvil isocrático: 0,60 ml/min.
- Temperatura de la columna: 24°C.

3.2.3.1.2. ELABORACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Se utilizó una fase móvil compuesta por tampón pH 2.70: metanol: acetonitrilo: ácido acético: trietilamina (74: 20: 4: 1: 1, v/v/v/v/v). El tampón es una solución acuosa al 0,40% de hidrogenofosfato de amonio (p/v) y 0,40% de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (p/v), que fue preparado con 2,96 g de hidrogenofosfato de diamonio y 2,96 g de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio diluido en 740 ml de agua bidestilada. Luego se agitó y se midió el pH ajustándolo a 2,70 mediante adición de ácido fosfórico al 85%. Se tomaron 740 ml de este tampón y se añadieron 200 ml de metanol, 40 ml de acetonitrilo, 10 ml de ácido acético y 10 ml de trietilamina. La fase móvil fue desgasificada haciendo burbujear gas helio de alta pureza en su reservorio.

3.2.3.1.3. METODOLOGÍA EXTRACTIVA

La fase extractiva es un procedimiento de purificación previo a la inyección de las muestras y estándares en el HPLC, con el objetivo de eliminar sustancias presentes en la muestra que puedan interferir con la lectura de MFX.

En la técnica de detección de MFX, se empleó un patrón interno (PI), que consiste en una sustancia añadida a la muestra o las soluciones estándares previo a la fase extractiva, de tal manera que la concentración del PI en todas ellas sea siempre la misma (concentración fija). De esta manera, los resultados son expresados como una relación entre el área bajo la curva de MFX (AUC_m) y el área bajo la curva del PI (AUC_{pi}). El PI utilizado fue ofloxacina.

Una vez en el laboratorio, las muestras de suero fueron descongeladas lentamente a temperatura de refrigeración (en la nevera). Durante el procesado de las muestras, en todo momento estuvieron protegidas de la incidencia de la luz solar. Se prepararon dos baterías de tubos de vidrio de 15 ml: con tapón a rosca para centrífuga y sin tapón identificados con el mismo sistema alfanumérico de las planillas.

Las muestras de suero y leche, como de ofloxacina se homogeneizaron mediante agitación en tubos Eppendorf, durante 5 minutos a 800 rpm. Posteriormente, se introdujo una alícuota de 300 µl de las muestras (suero o leche) en un tubo de centrífuga de 15 ml de capacidad con tapón a rosca. Se añadieron 75 µl de una solución de patrón interno (a una concentración de 5 µg/ml de ofloxacina, disuelta en ácido fórmico 0,10 N. La concentración final de patrón interno en la muestra antes del

procesado fue de 1 µg/ml). La mezcla fue agitada a 800 rpm. Se añadieron 4,50 ml de triclorometano, se taparon los tubos y se agitaron nuevamente durante 10 minutos a 1000 rpm. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 7 minutos y 10°C. Se separó la fase orgánica con pipetas Pasteur, y se traspasó a otro tubo de vidrio, para su desecado en corriente de nitrógeno a 40°C durante 20 minutos. El residuo obtenido se reconstituyó con 150 µl de fase móvil y se colocaron en insertos protegidos en frasco esmerilado con septum y se cargaron en la gradilla del inyector automático para proceder a su lectura. El volumen de inyección en el cromatógrafo fue de 20 µl.

3.2.3.2. MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE DIFUSIÓN EN AGAR

La realización del método microbiológico de difusión en agar fue llevada a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Lorenzutti (2009) para la determinación de MFX en suero de cabras. Es una modificación de la técnica descrita por Bennett *et al* (1966). En el presente estudio, la técnica fue validada para la determinación de MFX en leche de cabra.

El microorganismo utilizado fue *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, el cual fue sembrado en caldo cerebro corazón e incubado durante 24 horas a 38°C. Una vez lograda la turbidez deseada (0,50 de la escala de McFarland), el inóculo fue mezclado con agar Mueller – Hinton atemperado a 45°C, a razón de 5 ml de inóculo por cada 250 ml de agar. Posteriormente, el agar fue distribuido en placas de Petri de 90 mm de diámetro (15 ml/placa). Una vez solidificado el agar, se realizaron seis pocillos de 5 mm con un sacabocados en donde se colocaron las muestras y los patrones de suero o de leche por triplicado. Para garantizar su correcta lectura, a las placas se les realizó una señal de inicio con marcador indeleble encima de uno de los pocillos, la cual representó aquel donde se comenzó a colocar las muestras o patrones, y donde debía comenzar la lectura de los halos de inhibición. La colocación de las muestras y patrones se realizó en sentido horario a partir de la marca de inicio, siguiendo un patrón de siembra previamente planificado registrado en una planilla guía, la cual serviría posteriormente para identificar a que muestras y patrones pertenecían los halos de inhibición. Las placas fueron incubadas a 38°C durante 24 horas hasta su lectura. La lectura de los halos se realizó en sentido contrario al de las agujas del reloj a partir de la marca de inicio, tomando como referencia el patrón de siembra.

Se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano mediante calibre digital y se expresaron los mismos en milímetros. Debido a que tanto los patrones como las muestras de suero y leche fueron sembrados por triplicado, el diámetro de halo registrado se correspondió al promedio de los halos de inhibición de cada patrón o muestra.

La determinación de la cantidad MFX en las muestras se realizó por interpolación en una recta de calibración, generada mediante una secuencia de soluciones patrones (estándares) elaboradas a partir de suero o leche de cabra, cuya concentración de MFX es conocida.

3.2.3.3. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la validación de ambos métodos analíticos se utilizaron los criterios de linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y límite de cuantificación (LC), de acuerdo con los procedimientos de validación de métodos analíticos, GL 2/98, del programa de Cooperación Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos Veterinarios (VICH, 1998).

3.2.3.3.1. LINEALIDAD EN SUERO Y LECHE

La linealidad, indica la relación que existe entre los valores de una variable independiente, en este caso las concentraciones de los estándares de MFX y una variable dependiente como es el caso de las relaciones entre el área bajo la curva (AUC) de MFX y la correspondiente a OFX (AUC_m/AUC_o), o los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con el método microbiológico, para cada patrón analizado.

Para el método de HPLC/uv, es necesario demostrar que en el rango de concentraciones de los estándares, existe una relación lineal entre las concentraciones de los mismos y las AUC obtenidas. Para ello, se utilizó una prueba de regresión lineal de las AUC frente a las diferentes concentraciones de cada estándar, la cual permitió obtener una recta de calibración, utilizada para calcular las concentraciones de cada muestra a partir de las AUC.

En el caso del método microbiológico, es necesario demostrar que en el rango de concentraciones de los estándares, existe una relación logarítmica entre las concentraciones de los mismos y los diámetros de los halos de inhibición resultantes.

Para ello, se utilizó una prueba de regresión no lineal entre los diámetros de los halos de inhibición y las diferentes concentraciones de cada estándar. De esta manera, la ecuación resultante de la curva de calibración, permitió el cálculo de las concentraciones de MFX presentes en las muestras analizadas.

Para realizar las rectas y curvas de calibración se utilizaron patrones de referencia con concentraciones conocidas de MFX (fármaco puro), en suero y leche caprina. Los patrones utilizados en el método cromatográfico comprendieron concentraciones entre 0,025 – 15,000 µg/ml para suero y de 0,025 – 10,000 µg/ml para leche. Estas soluciones fueron enriquecidas con el PI de ofloxacina tal como se describe en el apartado de metodología extractiva. Los resultados de los análisis de los patrones se expresaron como la razón entre el ABC de MFX y el correspondiente de OFX (AUC_m/AUC_o). A los fines de mejorar el ajuste de las rectas de suero y leche del método cromatográfico, se utilizaron dos rectas de calibración para concentraciones bajas y altas. Para suero, se utilizó una recta de concentraciones bajas comprendida entre 0,025 – 0,500 µg/ml y otra de concentraciones altas entre 0,500 – 15,000 µg/ml. Para el caso de las rectas de calibración en leche, se utilizó una recta de concentraciones bajas comprendida entre 0,025 – 0,500 µg/ml y otra de concentraciones altas entre 0,500 – 10,000 µg/ml.

Los patrones utilizados en el método microbiológico para la validación de la técnica comprendieron concentraciones de MFX entre 0,049 – 12,500 µg/ml para suero, y 0,098 – 12,500 µg/ml para leche. En este caso, se utilizó solamente una curva logarítmica de calibración.

Las soluciones patrón fueron preparadas por sextuplicado, y fueron analizadas por duplicado en tres momentos del día (mañana, tarde y noche). De esta manera se utilizaron seis determinaciones por cada concentración para el cálculo de la recta de calibración.

Para el cálculo de precisión, exactitud y LC (*vide infra*), se seleccionaron tres concentraciones: 0,025, 0,500 y 2,500 µg/ml para HPLC/uv (suero y leche), mientras que en el caso del método microbiológico fueron utilizadas concentraciones de 0,049, 6,250 y 12,500 µg/ml para suero, y 0,098, 6,250 y 12,500 µg/ml para leche. En ambos métodos, las soluciones patrón se inyectaron por duplicado tres veces por día (mañana, tarde y noche) durante tres días, por lo que para estas concentraciones, se obtuvieron 18 determinaciones de cada una.

3.2.3.3.1.1. PRECISIÓN

La precisión se define como la variación existente entre los resultados aportados por el método analítico. De este modo, la precisión refleja la variabilidad propia del método analítico al analizar la muestra.

Para medir la precisión de cada método analítico se utilizó el coeficiente de variación (CV), definido por la ecuación 4.

Ecuación 4:

$$\text{Precisión (\%)} = \frac{DE}{media} \times 100$$

Donde DE es el desvío estándar de los patrones estándar analizados.

Para su determinación, se calculó un CV de cada concentración en un día, utilizando las determinaciones por sextuplicado de tres concentraciones patrones (variación intradía), y otro CV utilizando tres concentraciones por sextuplicado de tres días consecutivos (variación interdía).

Para considerar un método preciso, la variación intradía e interdía no debe ser superior al 15% (VICH, 1998).

3.2.3.3.1.2. EXACTITUD

La exactitud refleja la diferencia existente entre el promedio de los resultados obtenidos mediante la lectura de un patrón o estándar, y el verdadero valor de la concentración patrón (VICH, 1998). De esta manera, la exactitud es un indicador de la capacidad del método analítico en detectar realmente la concentración de fármaco presente en una muestra.

Para calcular la exactitud se aplicó la ecuación 5.

Ecuación 5:

$$\left(\frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} \right) \times 100$$

Para su cálculo, es necesario utilizar la ecuación de las rectas de calibración a los fines de convertir las relaciones entre AUCm/AUCo o los diámetros de halo para cada concentración patrón, en concentraciones séricas o lácteas. De esta manera, se utilizó el promedio de tres concentraciones patrón por sextuplicado (0,025, 0,500 y 2,500 µg/ml).

Para considerar el método analítico exacto, la variación entre la concentración calculada y la teórica no debe superar el 20% (la concentración calculada debe encontrarse entre el 80 – 120% de la teórica) (VICH, 1998).

3.2.3.3.1.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El LC, se define como la mínima concentración que cumple con los criterios de precisión y exactitud citados anteriormente. La precisión aplicable al LC tiene un punto de corte de 20% en vez de 15% (VICH, 1998).

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA

3.2.4.1. AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE ESTAFILOCOCOS PROCEDENTES DE MASTITIS SUBCLÍNICAS CAPRINAS

Para el cálculo de los indicadores de eficacia se utilizaron datos de CIM procedentes de 114 cepas regionales de estafilococos (*S. aureus* 8 cepas y ECN 106 cepas) aisladas de mastitis caprinas en la provincia de Córdoba, Argentina.

Para el aislamiento bacteriano, se tomaron muestras de leche de los medios mamarios individuales de 651 animales que procedían de diferentes tambos caprinos ($n = 1302$). Se sembró un volumen de 0,01 ml de cada muestra de leche en agar base Columbia, suplementada con 5% de sangre de carnero desfibrinada, incubándose 24 a 48 horas a 35°C en aerobiosis. Los aislamientos fueron diferenciados del género *Streptococcus* basándose en la morfología de las colonias, tipo de hemólisis y prueba de catalasa. Los ECN fueron identificados tentativamente mediante la prueba de coagulasa en tubo. Se inocularon algunas colonias aisladas en 3 ml de caldo cerebro corazón (CCC), y se incubaron durante 18 h a 37°C. Posteriormente se colocó en tubo estéril 300 µl del cultivo, al cual se le agregó el mismo volumen de plasma de conejo. Se incubó el tubo en baño maría a 37°C, y se observó a las 4 y 24 horas la formación de un coágulo. Como control para la prueba de coagulasa se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould 305). Tras su identificación, los aislamientos fueron conservados a – 80°C en CCC con glicerol al 10% hasta la realización de las pruebas de susceptibilidad a la MFX.

3.2.4.2. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

La CIM se determinó por el método de dilución en agar según normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2013), empleando como cepa control *S.aureus* ATCC 29213.

Se utilizaron 8 diluciones de MFX en el intervalo de 0,025 a 3,200 µg/ml. Para elaborarlas, se disolvieron 8 mg (corregidos por pureza) del estándar de MFX (Vetoquinol, Francia; lote 111739) en 50 ml de agua destilada, realizando las subsiguientes diluciones.

Como medio de cultivo se empleó agar Mueller-Hinton el cual, tras esterilizarse en autoclave (120°C por 15 minutos), se colocó en baño termostático hasta llegar a una temperatura constante de 47°C. Las soluciones de MFX elaboradas previamente, se vertieron asépticamente en el medio de cultivo en una proporción 1:10 (5 ml de solución de MFX en 45 ml de agar); se homogeneizó cada erlenmeyer con agar y su respectiva dilución, se midió su pH, y se distribuyó su contenido (por duplicado) en placas de Petri hasta alcanzar un espesor de 4 mm. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 29213 cada vez que se realizó la prueba, para determinar el potencial deterioro del ATM. Además, se prepararon placas sin ATMs como control.

En cuanto al inóculo, se sembraron las cepas de ECN aisladas de la leche, en 5 ml de caldo tripteína de soja. Esta solución se incubó a 35°C hasta presentar turbidez, y se ajustó con densitómetro al patrón 0,50 de McFarland. Los cultivos ajustados a este estándar fueron diluidos en proporción 1:10 en caldo tripteína soja para obtener la concentración deseada de 10^7 UFC/ml.

A continuación, en cada placa con agar y su respectiva dilución de MFX, se colocaron las 114 cepas aisladas (8 cepas de *S. aureus* y 106 cepas de ECN), utilizando un multi-inoculador de Steers-Foltz. Se inoculó primero una placa control (sin ATM), y luego las que poseían la MFX (comenzando por la menor concentración), y finalmente otra placa control para asegurarse la ausencia de contaminación o de traspaso de ATM durante el proceso. Las placas, se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos del inóculo fuera absorbida por el agar. Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, las placas se observaron sobre una superficie oscura. Se registró la CIM como la concentración más baja de ATM que

inhibió completamente el crecimiento. No se consideraron colonias individuales o la zona borrosa causada por el inóculo. Una vez obtenidas las CIM de cada una de las cepas analizadas, se procedió a la determinación de las CIM₅₀, CIM₉₀ y CIM₉₉, de acuerdo a lo descrito en la sección de análisis estadístico (*vide infra*).

3.2.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE DATOS

Para el análisis farmacocinético de las concentraciones séricas y lácteas en el tiempo obtenidas a partir de las AUC_m/AUC_o o los diámetros de los halos de inhibición de las muestras analizadas, se utilizó el programa PK solution[®], versión 2.0. Se empleó un modelo no compartimental para el análisis de los datos.

La estimación de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo utilizando dos formas de cálculo. Una de ellas se basa en la estimación del área bajo la curva (AUC) descrita por el perfil concentración–tiempo, mediante la aplicación de la regla trapezoidal clásica. La segunda técnica, es el método de los residuales. El mismo, calcula una curva mediante regresión no lineal descomponiéndola en una serie de términos exponenciales correspondientes a las fases de absorción (si los hubiera), distribución y eliminación. Luego, estos términos exponenciales son utilizados para el cálculo de los diferentes parámetros farmacocinéticos. Ambos métodos de cálculo, se basan en la teoría del momento estadístico.

Obtenidos los parámetros farmacocinéticos, calculados por el programa PKsolutions[®] versión 2.0, se seleccionaron los de mejor ajuste y fueron utilizados para el análisis estadístico.

Los parámetros farmacocinéticos analizados para las concentraciones en suero fueron los siguientes:

- Constantes de absorción y eliminación (λ): Constantes λ_a o $\lambda_e = -2,303s$; siendo s la pendiente de absorción o eliminación, dependiendo el caso.

- $t_{1/2\lambda_a}$ o $t_{1/2\lambda_e}$: Semividas de absorción y eliminación = $t_{1/2}\lambda = \frac{0,693}{\lambda_n}$

- C_{inic} : Concentración inicial extrapolada al tiempo cero para la vía IV;

$C_{inic} = \sum C_n$ Donde C_n es la ordenada al origen de cada término de la ecuación exponencial.

- C_{\max} : Concentración máxima observada.
- T_{\max} : tiempo al que se observó la C_{\max} .
- AUC_{0-t} : área bajo la curva calculada mediante el método trapezoidal utilizando solamente los datos observados (no extrapolada al infinito).

$$AUC = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1}); \text{ siendo "n" el número de datos.}$$

- AUC_{∞} : área bajo la curva calculada mediante el método trapezoidal que combina el AUC_{0-t} con un valor extrapolado al infinito.

$$AUC_{\infty} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_n}{\lambda_z} \text{ Donde } C_n \text{ es la última concentración.}$$

- MRT: Tiempo medio de residencia: obtenido mediante el uso de cálculo trapezoidal del área. $MRT = \frac{AUMC}{AUC}$
- MAT: tiempo medio de absorción = $MRT_{\text{extravascular}} - MRT_{\text{intravenoso}}$.
- V_d : volumen de distribución aparente del área. Basado en el cálculo trapezoidal del AUC y la constante de eliminación.

$$V_d = \frac{\text{Dosis}}{AUC * \lambda}$$

- V_{ss} : volumen de distribución aparente en estado estable.

$$V_{ss} = \frac{\text{Dosis} \cdot [AUMC]}{[AUC]^2}$$

- Cl: aclaramiento sistémico basado en el cálculo trapezoidal del ABC_{∞} .

$$Cl = \frac{\text{Dosis}}{ABC_{\infty}}$$

- F: biodisponibilidad extravascular; calculada como la razón entre el AUC_{0-t} extravascular y el AUC_{0-t} intravascular.

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos para evaluar la biodisponibilidad láctea de MFX en leche de cabra, se tuvieron en cuenta aquellos que se citan en la bibliografía referente a diversos tipos de fluoroquinolonas en leche de bovinos, ovinos y caprinos (Shem-Tov *et al*, 1997; Abd-El-Aty y Goudah, 2002; Haritova *et al*, 2003; Fernández Varón *et al*, 2006; Ecuadero *et al*, 2007; Marín *et al*, 2007a; Marín *et al*, 2007b; Goudah y

Abo-El-Sooud, 2008; Singh *et al*, 2010). Los parámetros utilizados para valorar la biodisponibilidad láctea de fluoroquinolonas (y ATMs en general) fueron:

- Constantes de absorción y eliminación (λ): Constantes λ_a o $\lambda_e = -2,303s$; siendo s la pendiente de absorción o eliminación, dependiendo el caso.
- $t_{1/2\lambda a}$ o $t_{1/2\lambda e}$: Semividas de absorción y eliminación = $t_{1/2}\lambda = \frac{0,693}{\lambda_n}$
- C_{max} : Concentración máxima observada.
- T_{max} : tiempo al que se observó la C_{max} .
- AUC_{0-t} : área bajo la curva calculada mediante el método trapezoidal utilizando solamente los datos observados (no extrapolada al infinito).

$$AUC = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1}); \text{ siendo "n" el número de datos.}$$

- AUC_{∞} : área bajo la curva calculada mediante el método trapezoidal que combina el AUC_{0-t} con un valor extrapolado al infinito.

$$AUC_{\infty} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_n}{\lambda_z} \text{ Donde } C_n \text{ es la última concentración.}$$

- MRT: Tiempo medio de residencia: obtenido mediante el uso de cálculo trapezoidal del área. $MRT = \frac{AUMC}{AUC}$

El método de cálculo para los parámetros farmacocinéticos expuestos anteriormente es el mismo que el desarrollado para suero.

La biodisponibilidad láctea de MFX se evaluó con la relación $AUC_{0-t \text{ leche}} / AUC_{0-t \text{ suero}}$. Para determinar la persistencia de MFX en leche se utilizaron los índices $t_{1/2\lambda e \text{ leche}} / t_{1/2\lambda e \text{ suero}}$ y $MRT_{\text{leche}} / MRT_{\text{suero}}$.

Todos los parámetros e índices farmacocinéticos obtenidos de cada animal en cada tratamiento, se procesaron y se ajustaron de forma individual, y posteriormente fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Infostat[®], versión 2008.

3.2.6.DETERMINACIÓN DE LOS INDICADORES DE EFICACIA ANTIMICROBIANA PK/PD TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR A DOSIS ÚNICA Y CÁLCULO DE LA DOSIS MÚLTIPLE

Una vez realizado el análisis farmacocinético de los datos de dosis única y dosis múltiple, tras la administración IV e IM en suero y leche, se procedió al cálculo individual de los indicadores de eficacia antimicrobiana PK/PD para las CIM de ECN productores de mastitis en cabras. Los indicadores utilizados fueron C_{\max}/CIM_{90} y AUC_{0-24}/CIM_{90} .

Una vez calculados los índices PK/PD de eficacia antimicrobiana en la dosis única, se evaluó si los valores correspondientes eran adecuados. Dado que para fluoroquinolonas se aceptan puntos de corte de $C_{\max}/CIM_{90} > 8 - 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 30 - 50$ (Lister, 2002; Drusano, 2007; Papich, 2014), los puntos de corte seleccionados en esta tesis fueron: $C_{\max}/CIM > 8$ y $AUC_{0-24}/CIM > 50$. En caso que los índices PK/PD no cumplieran con las condiciones de eficacia determinadas anteriormente, se procedió al cálculo de la dosis necesaria para alcanzar niveles de eficacia óptimos. Para tal fin, se utilizó una ecuación descrita en los trabajos de Toutain *et al* (2004a) y Toutain (2009), basada en el aclaramiento observado (Cl), el punto de corte deseado del parámetro AUC_{0-24}/CIM , la CIM_{90} determinada en los patógenos regionales, la fracción libre de MFX en plasma (fL_p) y la biodisponibilidad observada tras la administración intramuscular a dosis única (F) (ecuación 6).

Ecuación 6:

$$Dosis\ diaria = \frac{Cl \times AUC/CIM_{deseado} \times CIM_{90}}{fL_p \times F}$$

El cálculo de la dosis diaria por vía IM se realizó de forma individual, tomando los datos de los seis animales de la vía IM a dosis única. Estos datos determinaron la dosis a utilizar en el ensayo multidoses por vía IM, en cabras con mastitis subclínica.

Posteriormente, tanto para los ensayos a dosis única como de dosis múltiple, se compararon los resultados obtenidos en los indicadores PK/PD relacionados a la eficacia antimicrobiana y a la prevención de selección de mutantes resistentes en cabras enfermas, y se contrastaron con las tasas de cura microbiológica para evaluar la relación existente entre los indicadores PK/PD y la respuesta a la terapia antimicrobiana. Para el

cálculo de los índices de eficacia se utilizaron los indicadores C_{\max}/CIM_{90} y AUC_{0-24}/CIM_{90} y para los índices de prevención de resistencias, se utilizaron las MPC bibliográficas referenciadas por Wetzstein *et al.* (2005), Awji *et al.* (2012) y Fernández-Palacios O'Connor (2013). Para el cálculo de los índices de prevención de selección de mutantes resistentes se utilizaron los parámetros C_{\max}/MPC_{90} , AUC_{0-24}/MPC_{90} y T_{MSW} . El índice T_{MSW} se calculó a partir de las curvas de concentración sérica vs tiempo de cada animal en los ensayos de dosis única y múltiple. Para ello se tomó el intervalo de tiempo en el que las concentraciones se encontraban dentro de la MSW en la fase de absorción y eliminación para cada animal y para cada patógeno analizado. Ambos tiempos se sumaron y se obtuvo el T_{MSW} en horas, que se transformó en un porcentaje del intervalo de dosis.

3.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros farmacocinéticos en suero y leche de la vía IV e IM a dosis única, y los correspondientes a la vía IM a dosis múltiple, se sometieron a una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) por bloques, para poder determinar posibles diferencias entre las vías de administración, entre las sucesivas administraciones, entre medios mamarios sanos e infectados, y en la producción láctea de los medios sanos e infectados a lo largo del tratamiento con MFX. Se utilizó como prueba *post hoc* el test de diferencias de mínimos cuadrados de Fisher. La comprobación de los supuestos del ANOVA se realizó mediante un test de Shapiro Wilk a los residuales, y un ANOVA a los residuos absolutos, a fin de demostrar la normalidad y homocedasticidad de los datos.

Para el análisis estadístico de los índices farmacocinéticos $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{suero}}$, de $t_{1/2\text{leche}}/t_{1/2\text{leche suero}}$ y $MRT_{\text{leche}}/MRT_{\text{suero}}$, se comprobaron los supuestos de normalidad realizando un test de Shapiro Wilks. Luego se utilizó una prueba *t* apareada para analizar posibles diferencias entre los parámetros de leche y suero, respectivamente para AUC, $t_{1/2\text{leche}}$ y MRT. Este análisis se llevó a cabo para establecer si los valores de los índices farmacocinéticos de MFX en leche poseen significancia estadística o no.

Cuando los datos no demostraron estar normalmente distribuidos, se utilizaron pruebas no paramétricas: test de Friedman o Wilcoxon, a los fines de comparar los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

En el ensayo multidosis en cabras enfermas, se realizó una prueba de correlación con el fin de evaluar el efecto de la producción láctea sobre los parámetros de MFX en suero y leche. Se realizó un test de Shapiro Wilks para demostrar la normalidad de los datos. Luego se utilizó un test de correlación de Pearson para los datos normales y el test de Spearman para los datos que no demostraron normalidad.

El cálculo de las CIM₅₀, CIM₉₀ y CIM₉₉, se realizó mediante la aplicación de las frecuencias acumuladas sobre los datos de CIM individuales de cada cepa.

El nivel de significancia utilizado en todas las pruebas estadísticas realizadas fue 5% ($p < 0,05$).

IV . Resultados

4. RESULTADOS

4.1. MÉTODO DE SELECCIÓN DE ANIMALES

La tabla 14, muestra los datos de identificación, edad, peso y RCS de los animales que participaron en el estudio de dosis única por vía IM en animales sanos. Cabe destacar que los cultivos bacterianos de leche realizados de cada medio mamario en cada animal resultaron negativos.

Tabla 14: identificación, edad, peso, producción láctea y RCS de los animales utilizados en los ensayos de MFX a dosis única (n = 6).

Identificación	Caravana	Edad (Años)	Peso (kg)	Producción (L/día)	pH lácteo	RCS ($\times 10^3$)/ml
1	08	3,00	41,30 \pm 1,15	1,29 \pm 0,05	6,56 \pm 0,08	485,00
2	04	3,50	44,70 \pm 1,16	1,04 \pm 0,21	6,63 \pm 0,40	410,00
3	05	5,00	48,30 \pm 2,31	1,04 \pm 0,75	6,67 \pm 0,01	425,00
4	14	4,00	44,70 \pm 0,58	1,27 \pm 0,79	6,56 \pm 0,11	387,00
5	16	3,00	40,30 \pm 0,58	1,24 \pm 0,19	6,70 \pm 0,20	398,00
6	21	3,50	32,30 \pm 0,57	1,03 \pm 0,15	6,49 \pm 0,11	415,00

Nota: los datos de peso, producción láctea y pH lácteo se expresan como media \pm desviación estándar, considerando ambas vías (IV e IM) y un período de lavado de 15 días entre cada experiencia.

La tabla 15 muestra los datos de edad, peso, producción y resultados del cultivo microbiológico de leche. En la tabla 16 se muestran los datos de producción, RCS y pH de los medios mamaros sanos e infectados. El test estadístico empleado para la comparación de los datos de producción láctea, RCS y pH lácteo fue el ANOVA por bloques, con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$).

Tabla 15: identificación, caravana (crótal), edad, peso, producción láctea y resultados del cultivo de leche, de los animales utilizados para la realización del ensayo de MFX a dosis múltiple.

Identificación	Caravana	Edad (Años)	Peso (kg)	Producción (L/día)	Cultivo
1	48	3,00	40,60	0,80	ECN
2	180	3,50	29,80	0,15	ECN
3	21	4,50	39,10	0,10	ECN
4	160	4,00	45,90	0,30	ECN
5	164	3,00	41,10	0,45	ECN
6	61	3,50	44,20	0,43	ECN
7	199	5,00	35,50	0,45	ECN

ECN: estafilococo coagulasa negativo.

Tabla 16: datos de producción láctea, RCS y pH lácteo entre los medios mamarios infectados y sanos.

Parámetro	Medio sano	Medio infectado	Valor <i>p</i>
Producción (L/día)	0,26 ± 0,15	0,12 ± 0,15	0,0450
RCS (x10 ³)/ml	540,71 ± 125,74	1389,00 ± 173,48	0,0002
Ph	6,57 ± 0,03	6,72 ± 0,04	0,0001

Nota: los datos se presentan como media ± desviación estándar. Valor de significancia $p < 0,05$.

4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MARBOFLOXACINA EN SUERO Y LECHE

4.2.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/uv)

En las condiciones cromatográficas descritas, los tiempos de retención de MFX y OFX fueron respectivamente 8,28 y 10,29. En la figura 5 se expone un cromatograma, donde se observan las AUC para MFX y OFX y los tiempos de retención para MFX y OFX.

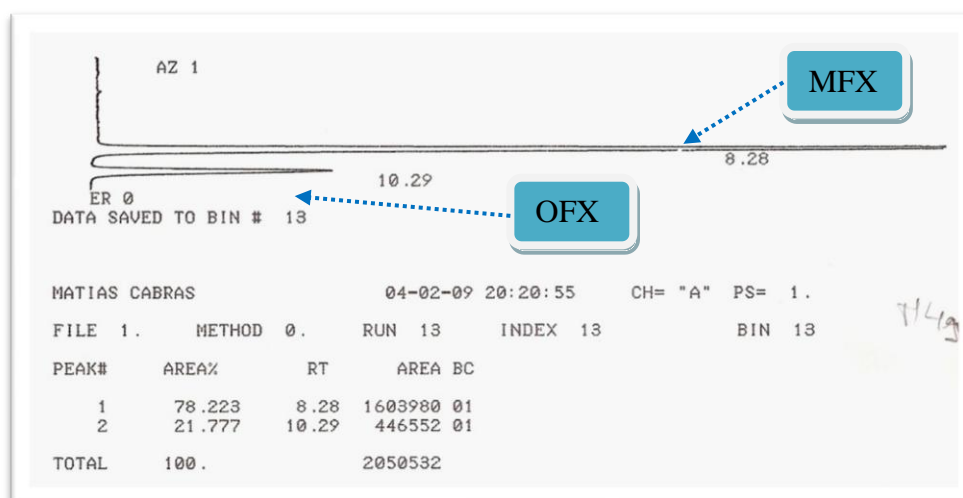


Figura 7: cromatograma de marbofloxacina (MFX) y ofloxacina (OFX).

Los resultados de la linealidad, exactitud, precisión y límites de cuantificación obtenidos por HPLC para el suero y la leche se resumen en los siguientes apartados. Para mayor detalle, se pueden consultar todos los valores en el “Anexo” entre las tablas 66 a 73.

4.2.1.1. LINEALIDAD, EXACTITUD, PRECISIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EN SUERO

Se obtuvieron dos ecuaciones de linealidad mediante la aplicación de regresión lineal simple: una recta de concentraciones bajas (0,025 – 0,500 µg/ml) y una recta de concentraciones altas (0,500 – 15,000 µg/ml). En las figuras 8 y 9 se muestran las rectas de calibración para concentraciones bajas y altas, respectivamente.

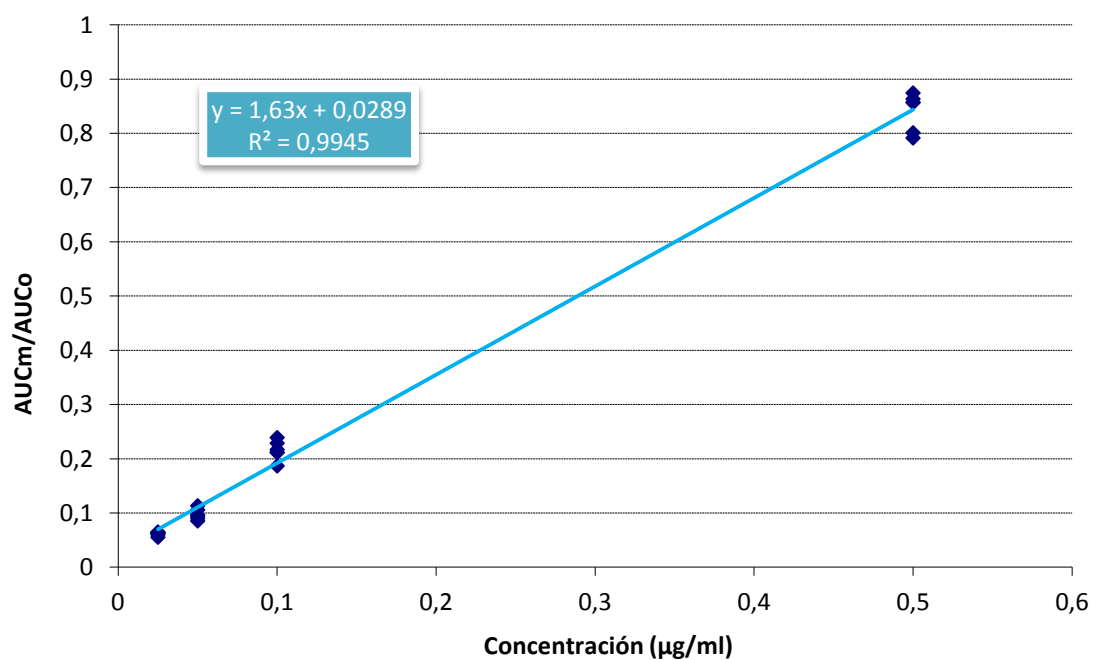


Figura 8: recta de calibración de concentraciones bajas (0,025 – 0,500 µg/ml). Para la concentración de 0,025 se utilizaron 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. En el gráfico se expone la ecuación de la recta y el ajuste (R^2).

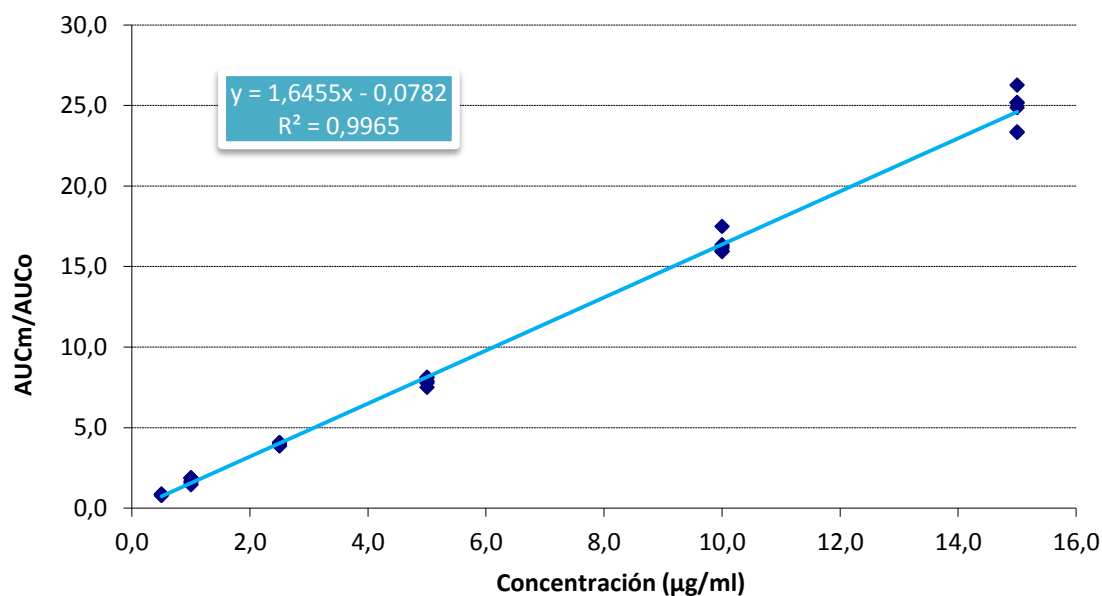


Figura 9: recta de calibración de concentraciones altas (0,500 – 15,000 µg/ml). Se utilizaron 6 lecturas por concentración. En el gráfico se expone la ecuación de la recta y el ajuste (R^2).

En la tabla 17 se exponen los valores de exactitud para las tres concentraciones utilizadas (0,025, 0,500 y 2,500 µg/ml). Para el cálculo de la concentración de 0,025 fueron utilizadas 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. Los resultados se encontraron entre 80 – 120%.

Tabla 17: técnica HPLC; exactitud de marbofloxacin en suero.

0,025 µg/ml		0,500 µg/ml		2,500 µg/ml	
Media	DE	Media	DE	Media	DE
85,762	11,080	99,613	2,319	98,590	2,219

DE: desviación estándar.

En las tablas 18 y 19 se exponen los valores de la variación intra e interdía para las tres concentraciones utilizadas (0,025, 0,500 y 2,500 µg/ml). Para el cálculo de la concentración de 0,025 fueron utilizadas 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. El coeficiente de variación fue inferior al 15% en todos los casos.

Tabla 18: variación intradía de las relaciones AUC_m/AUC_o en suero.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,003	0,061	5,768	0,035	0,840	4,178	0,091	3,978	2,295	4,081	1,738

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Tabla 19: variación interdía de las relaciones AUC_m/AUC_o en suero.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,007	0,060	11,008	0,046	0,794	5,855	0,126	3,884	3,241	6,702	3,952

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

El límite de cuantificación (LC) obtenido fue de 0,025 µg/ml. La exactitud y la precisión del LC fueron de 85,76% y 5,77% respectivamente. Se utilizaron 18 determinaciones para el cálculo del LC, su exactitud y precisión.

4.2.1.2. LINEALIDAD, EXACTITUD, PRECISIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EN LECHE

Se obtuvieron dos ecuaciones de linealidad mediante la aplicación de regresión lineal simple: una recta de concentraciones bajas (0,025 – 0,500 µg/ml) y una recta de concentraciones altas (0,500 – 10,000 µg/ml). En las figuras 10 y 11 se muestran las rectas de calibración para concentraciones bajas y altas, respectivamente.

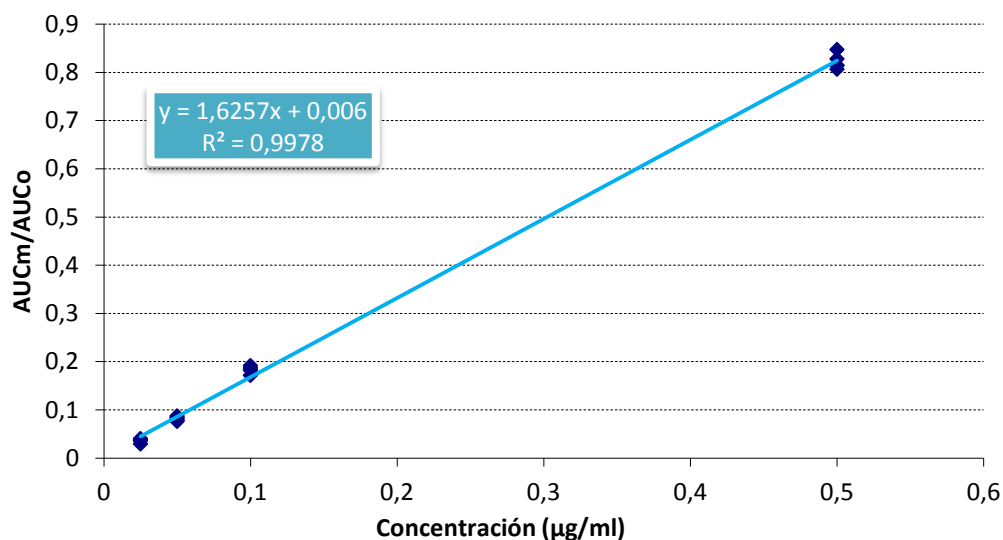


Figura 10: recta de calibración de concentraciones bajas (0,025 – 0,500 µg/ml). Para la concentración de 0,025 se utilizaron 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. En el gráfico se expone la ecuación de la recta y el ajuste (R^2).

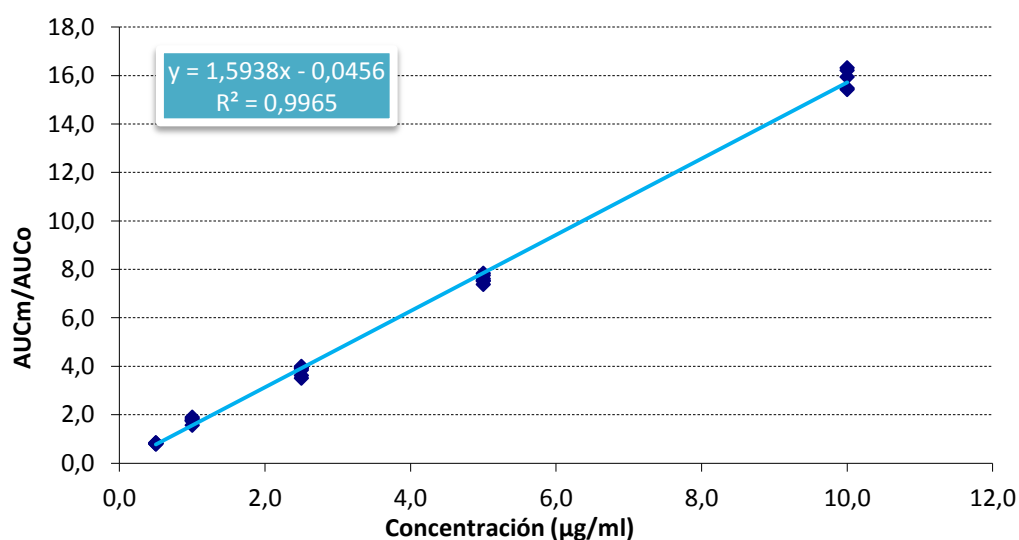


Figura 11: recta de calibración de concentraciones altas (0,500 – 10,000 µg/ml). Se utilizaron 6 lecturas por concentración. En el gráfico se expone la ecuación de la recta y el ajuste (R^2).

En la tabla 20 se exponen los valores de exactitud para las tres concentraciones utilizadas (0,025, 0,500 y 2,500 µg/ml). Para el cálculo de la concentración de 0,025

fueron utilizadas 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. Los resultados se encuentran entre el 80 y 120%.

Tabla 20: técnica HPLC; exactitud de marbofloxacin en suero.

0,025 µg/ml		0,500 µg/ml		2,500 µg/ml	
Media	DE	Media	DE	Media	DE
89,069	13,815	99,706	2,479	94,380	4,900

DE: desviación estándar.

En las tablas 21 y 22 se exponen los valores de variación intradía e interdía, respectivamente, para las tres concentraciones utilizadas. Para el cálculo de la concentración de 0,025 fueron utilizadas 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. El coeficiente de variación en todos los casos fue menor a 15%.

Tabla 21: técnica HPLC; variación intradía de las relaciones AUC_m/AUC_o en leche.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,003	0,046	5,590	0,029	0,719	4,039	0,076	3,993	1,909	3,846	1,848

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Tabla 22: técnica HPLC; variación interdía de las relaciones AUC_m/AUC_o en leche.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,006	0,041	14,072	0,051	0,769	5,856	0,172	3,914	4,393	8,107	5,218

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

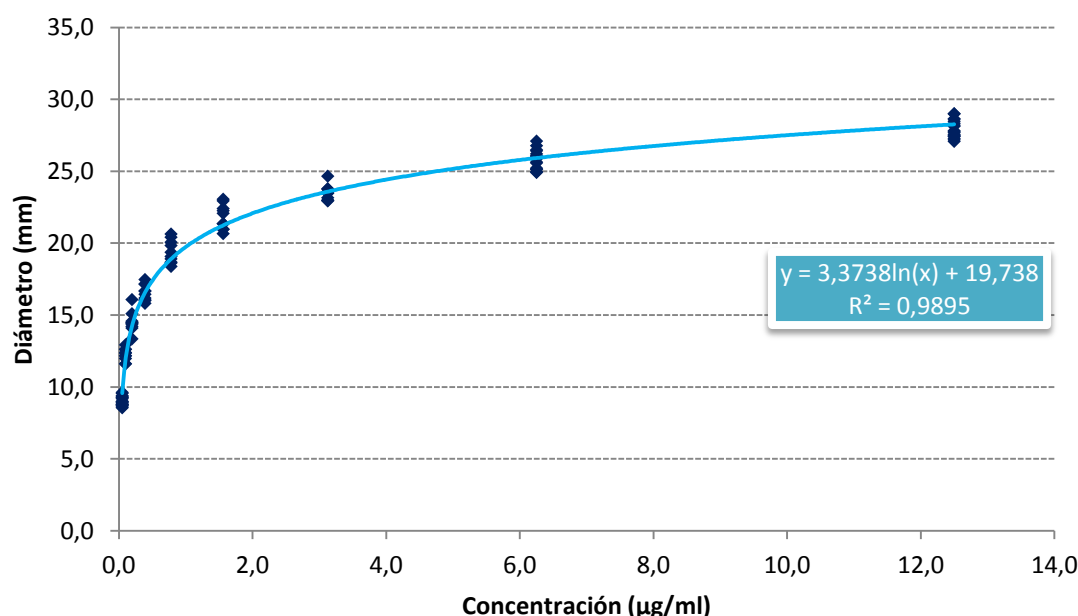
El LC obtenido para la leche por la técnica HPLC fue de 0,025 µg/ml. La exactitud y la precisión del LC fueron de 89,07% y 5,59%, respectivamente. Se utilizaron 18 determinaciones para el cálculo del LC, su exactitud y precisión.

4.2.2. MÉTODO MICROBIOLÓGICO

En los apartados siguientes se resume la información de la validación del método microbiológico para suero y leche caprina, pudiendo consultarse en el “anexo” las tablas 74 a 81, para mayor detalle.

4.2.2.1. LINEALIDAD, EXACTITUD, PRECISIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EN SUERO

Tras el análisis de los patrones en suero por método microbiológico, se obtuvo una ecuación de linealidad mediante la aplicación de regresión no lineal logarítmica en el rango de concentraciones de 0,049 – 12,500 µg/ml. En la figura 12 se muestra la recta de calibración obtenida.



por concentración. Para el método microbiológico, los resultados se encontraron entre 80 – 120%.

Tabla 23: método microbiológico; exactitud de marbofloxacin en suero.

0,049 µg/ml			6,250 µg/ml		12,500 µg/ml	
Media	DE		Media	DE	Media	DE
85,780	8,360		99,670	18,670	92,820	17,420

DE: desvío estándar.

En las tablas 24 y 25 se exponen los valores de la variación intra e interdía para las tres concentraciones utilizadas (0,049, 6,250 y 12,500 µg/ml). El coeficiente de variación en todos los casos fue menor a 15%.

Tabla 24: método microbiológico; variación intradía de los diámetros de halo (mm) en suero.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,576	28,145	2,047	0,514	25,829	1,989	0,399	9,123	4,369	2,802	1,358

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Tabla 25: método microbiológico; variación interdía de los diámetros de halo (mm) en suero.

0,025 µg/ml			0,500 µg/ml			2,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,617	27,954	2,208	0,621	25,855	2,403	0,323	9,031	3,580	2,731	0,742

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

El límite de cuantificación (LC) obtenido fue de 0,049 µg/ml. La exactitud y la precisión del LC fueron de 85,780% y 2,050% respectivamente. Se utilizaron 18 determinaciones para el cálculo del LC, su exactitud y precisión.

4.2.2.2. LINEALIDAD EN LECHE

Tras el análisis de los patrones en leche por método microbiológico, se obtuvo una ecuación de linealidad mediante la aplicación de regresión no lineal logarítmica en el rango de concentraciones de 0,098 – 12,500 µg/ml. En la figura 13 se muestra la curva de calibración obtenida.

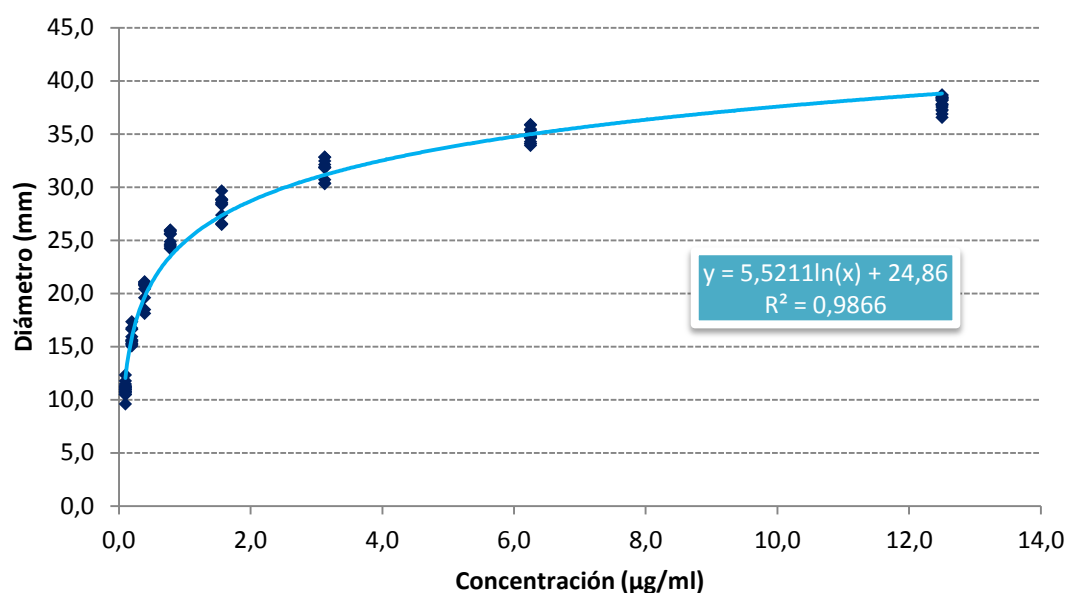


Figura 13: curva de calibración de MFX en leche (0,098 – 12,500 µg/ml). Para la concentración de 0,098 se utilizaron 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. En el gráfico se expone la ecuación de la curva y el ajuste (R^2).

En la tabla 26 se exponen los cálculos de exactitud para las tres concentraciones utilizadas (0,098, 6,250 y 12,500 µg/ml). Para la concentración de 0,098 se utilizaron 18 lecturas, mientras que para el resto de las concentraciones fueron tomadas 6 lecturas por concentración. Para el método microbiológico, los resultados se encontraron entre 80 – 120%.

Tabla 26: método microbiológico; exactitud para la marbofloxacin en leche.

0,098 µg/ml		6,250 µg/ml		12,500 µg/ml	
Media	DE	Media	DE	Media	DE
82,780	8,780	98,240	10,010	86,140	9,340

DE: desviación estándar.

En las tablas 27 y 28 se exponen los valores de la variación intra e interdía para las tres concentraciones utilizadas (0,098, 6,250 y 12,500 µg/ml). El coeficiente de variación en todos los casos fue menor a 15%.

Tabla 27: técnica microbiológica; variación intradía de los diámetros de halo (mm) en leche.

0,098 µg/ml			6,250 µg/ml			12,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,399	9,123	4,369	0,514	25,829	1,989	0,576	28,145	2,050	2,802	1,358

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Tabla 28: técnica microbiológica; variación interdía de los diámetros de halo (mm) en leche.

0,098 µg/ml			6,250 µg/ml			12,500 µg/ml			CV total	
DE	Media	CV	DE	Media	CV	DE	Media	CV	Media	DE
0,323	9,031	3,580	0,621	25,855	2,403	0,617	27,954	2,208	2,731	0,742

DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

El LC obtenido fue de 0,098 µg/ml. La exactitud y la precisión del LC fueron de 82,780% y 4,370%, respectivamente. Se utilizaron 18 determinaciones para el cálculo del LC, su exactitud y precisión.

4.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA

En las 106 cepas de ECN analizadas, el 33,00% presentó una CIM de 0,20 µg/ml, el 58,50% presentó una CIM de 0,40 µg/ml y el 8,50% presentó una CIM de 0,80 µg/ml. Una vez aplicada las curvas de distribución acumulada de los datos, la CIM₅₀ resultó entre 0,20 y 0,40 µg/ml, mientras que las CIM₉₀ y CIM₉₉ fueron de 0,40 y 0,80 µg/ml, respectivamente. Por otro lado, de las 8 cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas, el 50,00% presentó una CIM de 0,20 µg/ml (correspondiente a la CIM₅₀) y el otro 50,00% una CIM de 0,40 µg/ml (correspondiente a la CIM₉₀). En la tabla 29 se muestran los resultados del cálculo de la CIM para las cepas de ECN y en la tabla 30 para las cepas de *Staphylococcus aureus*. Las figuras 14 y 15 representan la distribución de CIM para las cepas de ECN y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Tabla 29: frecuencia de cepas de estafilococos coagulasa negativos (ECN) inhibidas por marbofloxacin entre 0,025 y 3,200 µg/ml.

CIM (µg/ml)	ECN inhibidos		
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Acumulada (%)
0,025	0	0,00	0,00
0,050	0	0,00	0,00
0,100	0	0,00	0,00
0,200	35	33,00	33,00
0,400	62	58,50	91,50
0,800	9	8,50	100,00
1,600	0	0,00	-
3,200	0	0,00	-

Tabla 30: frecuencia de cepas *Staphylococcus aureus* inhibidas por marbofloxacin entre 0,025 y 3,200 µg/ml.

CIM (µg/ml)	<i>S. aureus</i> inhibidos		
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Acumulada (%)
0,025	0	0,00	0,00
0,050	0	0,00	0,00
0,100	0	0,00	0,00
0,200	4	50,00	50,00
0,400	4	50,00	100,00
0,800	0	0,00	-
1,600	0	0,00	-
3,200	0	0,00	-

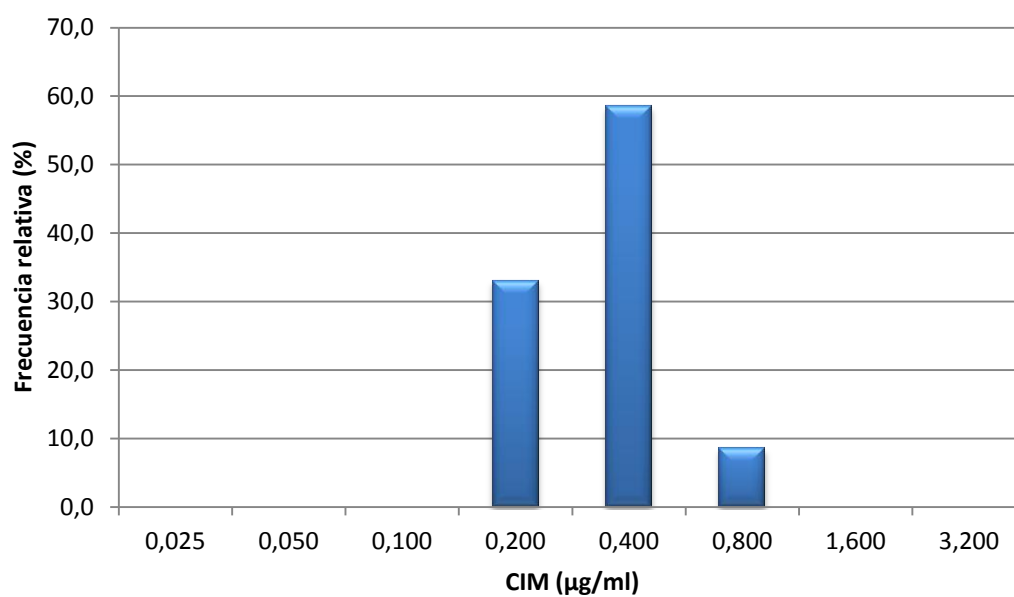


Figura 14: Distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de marbofloxacin frente a estafilococos coagulasa negativos (ECN; n = 106) aislados de leche caprina.

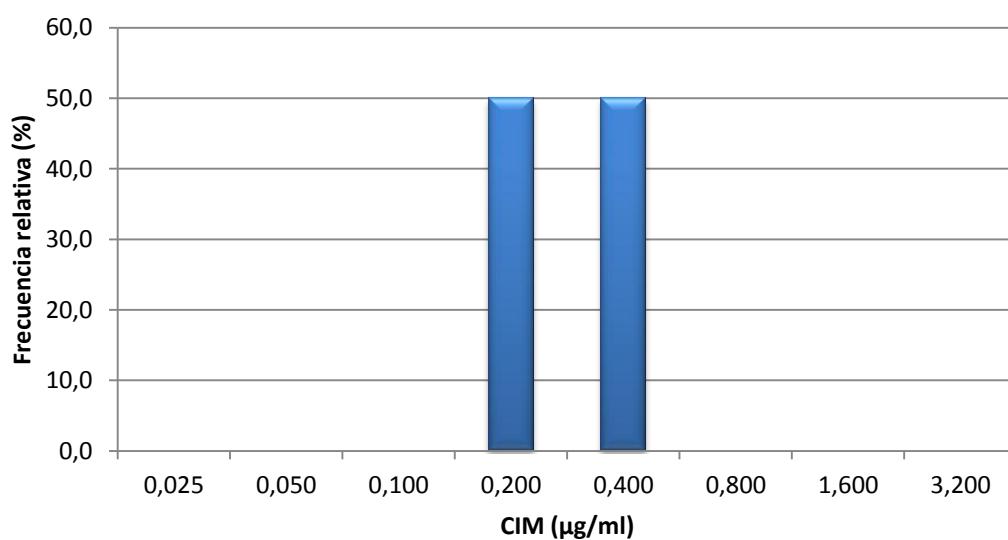


Figura 15: distribución de frecuencias de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de marbofloxacin frente a *Staphylococcus aureus* (n = 8) aislados de leche caprina.

4.4. MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA EN ANIMALES SANOS

A continuación se muestran los datos relativos a los análisis farmacocinéticos en suero y leche, tras la administración de MFX a dosis única en cabras sanas. Para mayor detalle, se pueden consultar los datos de origen en las tablas 82 a 85 y de 89 a 92 del anexo.

4.4.1. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO

Durante la realización del estudio no se apreciaron de visu signos de dolor o inflamación tras la administración de MFX.

El logaritmo de las concentraciones séricas promedio de MFX (con sus desviaciones estándares), en los diferentes tiempos de muestreo, tras la administración IV e IM, se expone en la figura 16. Las concentraciones séricas de MFX fueron superiores al límite de cuantificación hasta las 24 horas en ambas vías. Sólo en un animal se detectaron concentraciones superiores a este límite hasta las 36 h, en ambas vías de administración (tablas 82 y 84; anexo). Los parámetros farmacocinéticos de MFX tras la administración IV e IM, se exponen en la tabla 31.

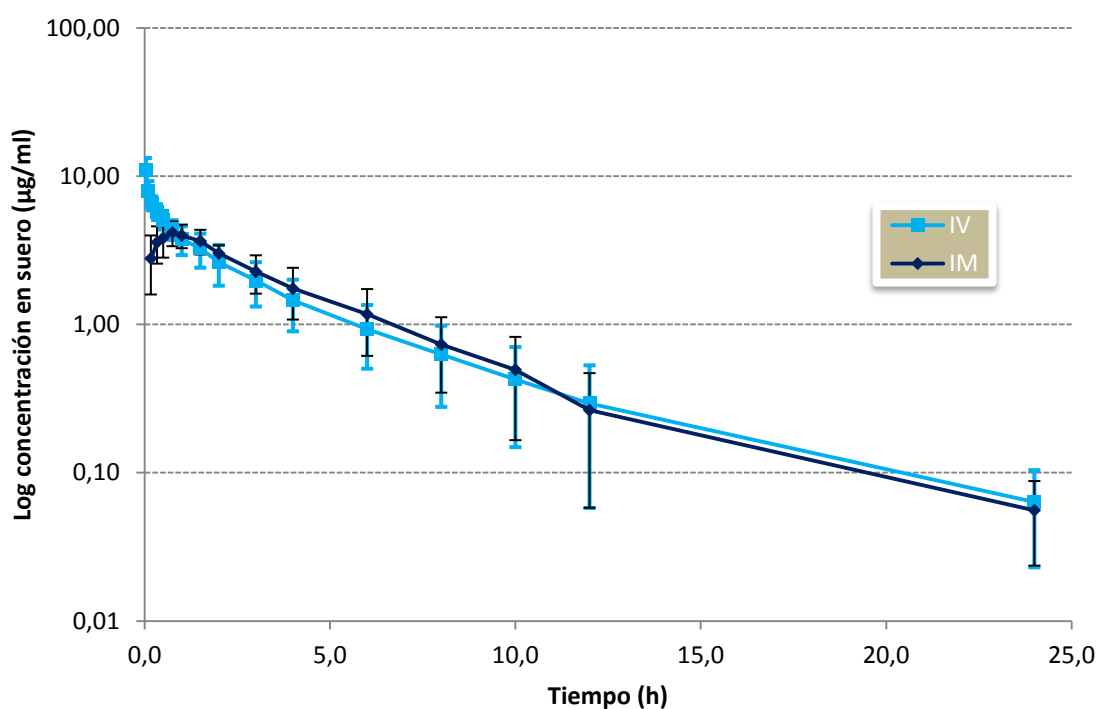


Figura 16: Evolución temporal del logaritmo de las concentraciones séricas de marbofloxacin (media \pm desviación estándar) tras la administración de una dosis de 5 mg/kg intravenosa (IV) e intramuscular (IM) en cabras lactantes (n = 6).

Como puede observarse en la figura 16, los niveles séricos de MFX, muestran una curva típica de una administración IV o IM, con una fase de absorción (solo para vía IM), distribución y una de eliminación.

Los resultados del análisis farmacocinético no compartimental de ambas vías se muestran en la tabla 31.

4.4.2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE

El logaritmo de las concentraciones lácteas promedio de MFX (con sus desviaciones estándares), en los diferentes tiempos de muestreo, tras la administración IV e IM, se exponen en la figura 17. La curva de concentración vs tiempo de la vía IV refleja una distribución del fármaco a glándula mamaria y leche. La concentración máxima observada tras administración IM, se alcanza a las 2 h (T_{max}) en todos los animales y en todos los tratamientos salvo en un animal de la vía IM, donde se alcanza a las 4 h. Las concentraciones de MFX en leche fueron superiores al límite de cuantificación hasta las 24 h post-administración, para ambas vías. Cuatro animales alcanzaron concentraciones superiores al LC a las 36 horas: 3 post-administración IV y 1 post-administración IM (tablas 83 y 85 del anexo).

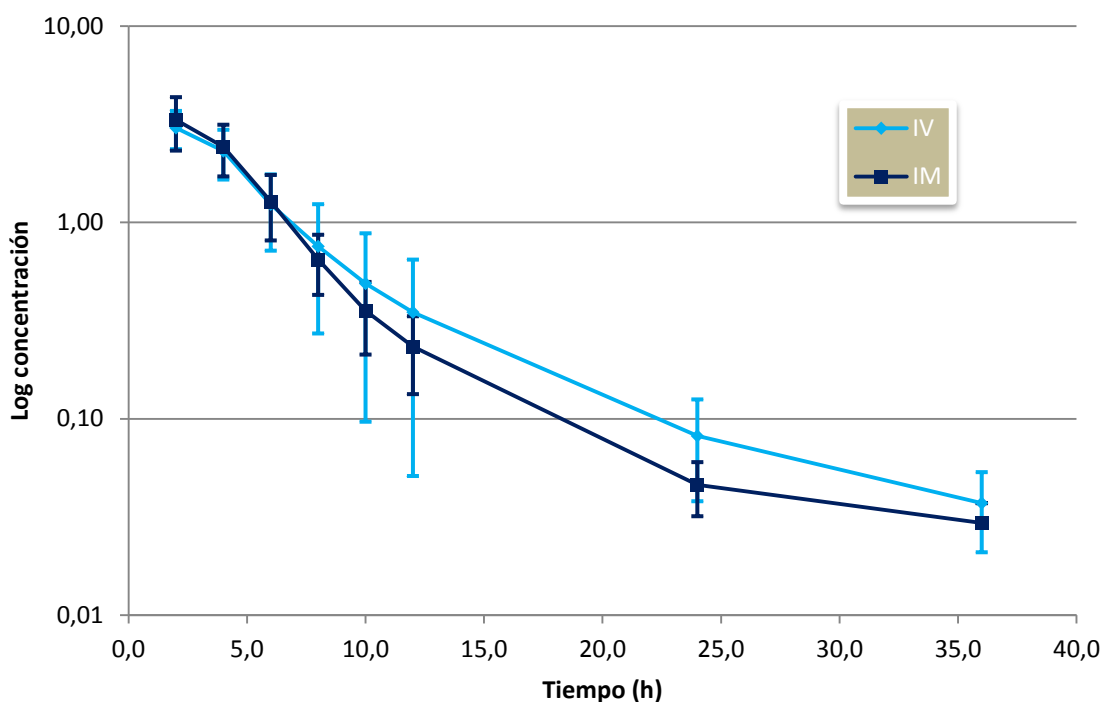


Figura 17: Evolución temporal del logaritmo de las concentraciones de marbofloxacina en leche (media \pm desviación estándar), tras la administración de una dosis de 5 mg/kg intravenosa (IV) e intramuscular (IM) en cabras lactantes (n = 6).

Los parámetros cinéticos de MFX (tabla 31), se calcularon mediante el análisis farmacocinético no compartimental de los datos de concentraciones lácteas vs tiempo de ambas vías.

4.4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE

Se realizó un test de ANOVA por bloques, a los datos de suero y de leche que demostraron cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos; con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). La prueba *post hoc* utilizada fue la de diferencia de mínimos cuadrados de Fisher. Aquellos parámetros que no cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se les aplicó un test no paramétrico de Friedman, con objeto de establecer diferencias entre las vías IV e IM para suero o para leche. En la tabla 31, se puede observar la ausencia/presencia de diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos estudiados.

Se consideraron particularmente los parámetros $AUC_{(0-t)}$, $t_{1/2\lambda e}$ y MRT de ambas vías de administración en suero y leche, para evaluar la biodisponibilidad y permanencia de la MFX en leche. Tras aplicar la prueba t apareada (tabla 32), se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente para la vía IV entre los parámetros cinéticos de MFX en leche *versus* suero. En la tabla 33 se puede observar la ausencia de diferencias significativas para los índices leche/suero, entre ambas vías de administración (IV *versus* IM).

Tabla 31: parámetros farmacocinéticos en suero y leche, tras la administración de dosis única de 5 mg/kg de marbofloxacin, por vía intravenosa (IV) e intramuscular (IM), en cabras sanas.

Parámetro	Intravenosa	Intramuscular	Valor <i>p</i>
Suero			
Constante λ_a	-	3,79 ± 0,72	-
Constante λ_e	0,19 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,305
$T_{1/2\lambda_a}$ (h)	-	0,19 ± 0,03	-
MAT (h)	-	0,59 ± 0,58	-
$T_{1/2\lambda_e}$ (h)	3,82 ± 0,99	4,25 ± 0,93	0,250
C_0 (µg/ml)	7,35 ± 0,71	-	-
C_{max} (µg/ml)	-	4,19 ± 0,81	-
T_{max} (h)	-	0,75 ± 0,16	-
$AUC_{(0-t)}$ (µg*h/ml)	20,12 ± 7,66	20,31 ± 6,77	0,573
AUC_{∞} (µg*h/ml)	20,63 ± 7,50	20,59 ± 6,73	0,581
MRT (h)	4,14 ± 1,15	4,72 ± 1,17	0,057
V_d (L/kg)	1,42 ± 0,45	-	-
V_{ss} (L/kg)	1,05 ± 0,24	-	-
Cl (L*kg/h)	0,27 ± 0,09	-	-
F (%)	-	103 ± 11	-
Leche			
Constante λ_a	1,05 ± 0,39	1,18 ± 0,73	0,737
Constante λ_e	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,081
$T_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,71 ± 0,18	0,71 ± 0,25	0,974
$T_{1/2\lambda_e}$ (h)	5,86 ± 0,37	4,59 ± 1,05 ^a	0,033
C_{max} (µg/ml)	3,03 ± 0,67	3,36 ± 0,97	0,186
T_{max} (h)	2,00 ± 0,00	2,33 ± 0,82	0,363
$AUC_{(0-t)}$ (µg*h/ml)	18,95 ± 7,79	17,93 ± 5,64	0,573
AUC_{∞} (µg*h/ml)	19,26 ± 7,85	18,25 ± 5,55	0,581
MRT (h)	6,36 ± 1,29	5,44 ± 0,59	0,113

C_0 : concentración inicial; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; F: biodisponibilidad; V_d : volumen de distribución aparente calculado en base al área; V_{ss} : volumen de distribución aparente en estado estacionario; λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; MAT: tiempo medio de absorción; MRT: tiempo medio de residencia; Cl: aclaramiento plasmático total; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} . Los resultados se expresan como promedio con su correspondiente desviación estándar. (^a): indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las vías de administración.

Tabla 32: parámetros farmacocinéticos empleados para el cálculo del cociente leche/suero, tras administración de una dosis de 5 mg/kg de MFX vía intravenosa e intramuscular en cabras sanas.

Parámetro	Leche	Suero	Valor <i>p</i>
Intravenosa			
AUC_(0-t)	18,95 ± 7,78	20,12 ± 7,66	0,035
T_{1/2λe}	5,86 ± 0,37	3,82 ± 0,99	0,004
MRT	6,36 ± 1,29	4,14 ± 1,15	0,001
Intramuscular			
AUC_(0-t)	17,93 ± 5,64	20,31 ± 6,77	0,255
T_{1/2λe}	4,59 ± 1,05	4,25 ± 0,93	0,623
MRT	5,44 ± 0,59	4,72 ± 1,17	0,175

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. (^a): indica diferencias significativas (*p* < 0,05) entre las vías de administración.

Tabla 33: índices suero/leche de MFX. Régimen de dosis única, en cabras sanas.

Parámetro	Intravenosa	Intramuscular	Valor <i>p</i>
AUC_(0-t) leche/suero	0,93 ± 0,08	0,89 ± 0,19	0,683
t_{1/2λe} leche/suero	1,62 ± 0,40	1,16 ± 0,48	0,118
MRT leche/suero	1,58 ± 0,29	1,22 ± 0,34	0,124

Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

4.4.4. CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE EFICACIA Y SIMULACIÓN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR

En la tabla 34 se muestran los resultados obtenidos del cálculo de los indicadores PK/PD tras la administración de 5 mg/kg IM de MFX. Valores de entre 30 – 60 se correlacionan con curación clínica y microbiológica, para patógenos Gram positivos (Lister, 2002; Drusano, 2007; Xiao y Xiao, 2008; Papich, 2014). Si consideramos el valor más exigente (AUC_(0-t)/CIM > 60), ninguno de los individuos tratados supera el punto de corte.

En la tabla 35 se muestran los valores calculados tras aplicar la ecuación 6 desarrollada en la sección material y métodos, para la predicción de la dosis diaria óptima para un esquema terapéutico multidosis que presente eficacia antibacteriana (Toutain *et al*, 2007; Toutain, 2009). Se consideró una fracción libre de MFX en plasma (*fLp*) del 25%, dado que en la bibliografía se reportan valores de *fLp* entre 22% y 27% según Bregante *et al* (2000), Bidgood y Papich (2005) e Ismail y El-Kattan (2007). La tabla presenta predicciones de dosis con tres niveles de AUC_(0-t)/CIM₉₀ (40, 50 y 60).

Tras la simulación, la dosis necesaria para obtener valores $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} \geq 60$ sería de $8,09 \pm 1,92$ mg/kg/día. Como puede observarse, de los 6 animales estudiados 3 requirieron valores > 8 mg/kg y uno valores de 10,43 mg/kg. De modo que optamos por seleccionar como dosis optima múltiple 10mg/kg, administrada cada 24 h, por vía IM.

Además del cálculo de los indicadores de eficacia PK/PD se procedió a calcular los indicadores de prevención de selección de mutantes C_{max}/CPM_{90} , $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ y T_{MSW} . A partir de datos de CPM para *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas con CIM_{90} de 0,50 µg/ml y MPC_{90} de 1,00 µg/ml y una cepa control ATCC 29213 con CIM_{90} de 0,25 µg/ml y MPC_{90} de 0,50 µg/ml (Fernández-Palacios, 2013), otra cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con CIM_{90} de 0,50 µg/ml y MPC_{90} de 3,50 µg/ml (Wetzstein *et al.*, 2005) y una cepa de *Staphylococcus intermedius* con CIM_{90} de 0,50 µg/ml y MPC_{90} de 3,30 µg/ml (Awji *et al.*, 2012) provenientes de la bibliografía. Los resultados del análisis se exponen en las tablas 36 y 37.

Los índices MPC_{90}/CIM_{90} fueron de 2,00, 2,00, 7,00 y 6,60 para *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas, la cepa control ATCC 29213, la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus intermedius*, respectivamente.

Tabla 34: cálculo de indicadores de eficacia PK/PD, a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM a dosis única) y las CIM regionales.

Parámetro	Animal						Media \pm DE
	1	2	3	4	5	6	
C_{max} (µg/ml)	5,07	4,55	4,31	3,71	2,81	4,68	4,19 \pm 0,81
C_{max}/CIM_{90} (0,4 µg/ml)	12,68	11,39	10,77	9,29	7,03	11,70	10,48 \pm 2,03
C_{max}/CIM_{99} (0,8 µg/ml)	6,34	5,69	5,39	4,64	3,52	5,85	5,24 \pm 1,01
$AUC_{(0-t)}$ (µg*h/ml)	19,07	22,97	32,35	18,98	14,08	14,41	20,31 \pm 6,77
$AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ (0,4 µg/ml)	47,66	57,42	80,88	47,45	35,19	36,03	50,77 \pm 16,92
$AUC_{(0-t)}/CIM_{99}$ (0,8 µg/ml)	23,83	28,71	40,44	23,72	17,60	18,01	25,39 \pm 8,46

DE: desviación estándar.

Tabla 35: simulación de dosis (mg/kg/día), basada en los datos farmacocinéticos de marbofloxacin por vía IM y tres puntos de corte del parámetro de eficacia $AUC_{(0-t)}/CIM$.

Indicador	Animal						Media \pm DE
	1	2	3	4	5	6	
$AUC_{(0-t)}/CIM_{90} = 40$	5,98	4,43	3,36	5,69	5,95	6,95	5,39 \pm 1,28
$AUC_{(0-t)}/CIM_{90} = 50$	7,47	5,54	4,21	7,11	7,43	8,69	6,74 \pm 1,60
$AUC_{(0-t)}/CIM_{90} = 60$	8,97	6,65	5,05	8,54	8,92	10,43	8,09 \pm 1,92

DE: desviación estándar.

Tabla 36: Indicadores de prevención de selección de mutantes C_{max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ calculados a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM de dosis única) y MPC bibliográficas.

Microorganismo	Animal						Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	
C_{max} ($\mu g/ml$)	5,07	4,55	4,31	3,71	2,81	4,68	4,19 \pm 0,81
C_{max}/MPC_{90}							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 $\mu g/ml$ ($n=1$)	1,45	1,30	1,23	1,06	0,80	1,34	1,20 \pm 0,23
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 $\mu g/ml$ ($n = 52$)	1,54	1,38	1,31	1,13	0,85	1,42	1,27 \pm 0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 $\mu g/ml$ ($n = 12$)	5,07	4,55	4,31	3,71	2,81	4,68	4,19 \pm 0,81
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 $\mu g/ml$ ($n=1$)	10,15	9,11	8,62	7,43	5,63	9,36	8,38 \pm 1,62
$AUC_{(0-t)}$ $\mu g \cdot h/ml$	19,07	22,97	32,35	18,98	14,08	14,41	20,31 \pm 6,77
$AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538a MPC ₉₀ = 3,50 $\mu g/ml$ ($n=1$)	5,45	6,56	9,24	5,42	4,02	4,12	5,80 \pm 1,93
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT MPC ₉₀ = 3,30 $\mu g/ml$ ($n = 52$)	5,78	6,96	9,80	5,75	4,27	4,37	6,15 \pm 2,05
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina MPC ₉₀ = 1,00 $\mu g/ml$ ($n = 12$)	19,07	22,97	32,35	18,98	14,08	14,41	20,31 \pm 6,77
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 MPC ₉₀ = 0,50 $\mu g/ml$ ($n=1$)	38,13	45,94	64,71	37,96	28,15	28,82	40,62 \pm 13,54

DS: desviación estándar. Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Tabla 37: Indicador de prevención de selección de mutantes T_{MSW} , calculado a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM a dosis única) y MPC bibliográficas.

Microorganismo	Animal						Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 μ g/ml ($n=1$)	6,48 (27)	9,39 (39)	13,92 (58)	8,58 (36)	NC	5,51 (23)	8,78 \pm 3,27 (37 \pm 14)
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 μ g/ml ($n = 52$)	6,37 (27)	9,09 (38)	12,94 (54)	7,78 (32)	NC	5,35 (22)	8,30 \pm 2,95 (35 \pm 12)
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 μ g/ml ($n = 12$)	2,57 (11)	3,58 (15)	5,43 (23)	2,56 (11)	3,31 (14)	2,72 (11)	3,36 \pm 1,10 (14 \pm 5)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 μ g/ml ($n=1$)	1,81 (8)	1,12 (5)	5,42 (23)	2,28 (9)	3,13 (13)	2,40 (10)	2,69 \pm 1,49 (11 \pm 6)

DS: desviación estándar. NC: no cuantificable. Los resultados se expresan en horas (% del intervalo de dosis dentro de la MSW). Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c). Los datos que figuran entre paréntesis corresponden a los porcentajes del intervalo de dosis que se encuentra en la ventana de selección de mutantes (MSW).

4.5. MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE EN ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA

A continuación se muestran los datos relativos a los análisis farmacocinéticos en suero y leche, tras la administración de una dosis diaria de MFX de 10 mg/kg, durante 5 días consecutivos en cabras con mastitis subclínica. Para mayor detalle, se pueden consultar los datos originales en el anexo.

4.5.1. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO

En la figura 18 se muestra el perfil de la evolución temporal de las concentraciones (medias \pm desviaciones estándares), en escala logarítmica, de la marbofloxacin en el esquema posológico multidosis propuesto para la vía IM. En las tablas 86 y 93 del anexo se detallan los datos individuales de las siete cabras.

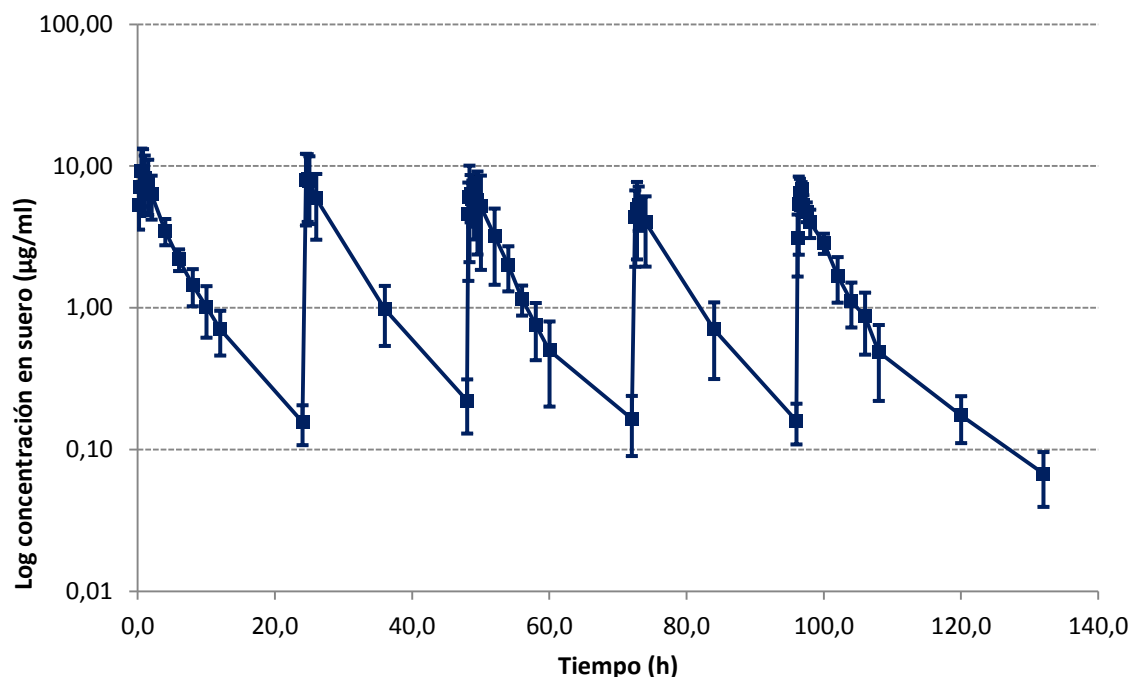


Figura 18: Evolución temporal del logaritmo de las concentraciones séricas de marbofloxacin (media \pm desviación estándar) tras la administración de 10 mg/kg/24h/5d vía intramuscular, en cabras con mastitis subclínica (n = 6).

No se observó acumulación de MFX en suero tras las administraciones repetidas de 10 mg/kg cada 24 horas. Tras la última administración, las concentraciones de MFX fueron superiores al límite de cuantificación hasta las 36 horas.

Los parámetros farmacocinéticos de la primera, tercera y quinta administración de MFX, resumidos en la tabla 38, se obtuvieron mediante análisis no compartimental.

4.5.2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE

La evolución del logaritmo de la concentración láctea (con su desviación estándar) de cada medio mamario vs tiempo, tras la administración de 10 mg/kg/día de MFX por vía IM en un régimen de dosis múltiple de cinco días; se muestra en la figura 19. En la tablas 87 y 88 del anexo se detallan las concentraciones individuales de las seis cabras.

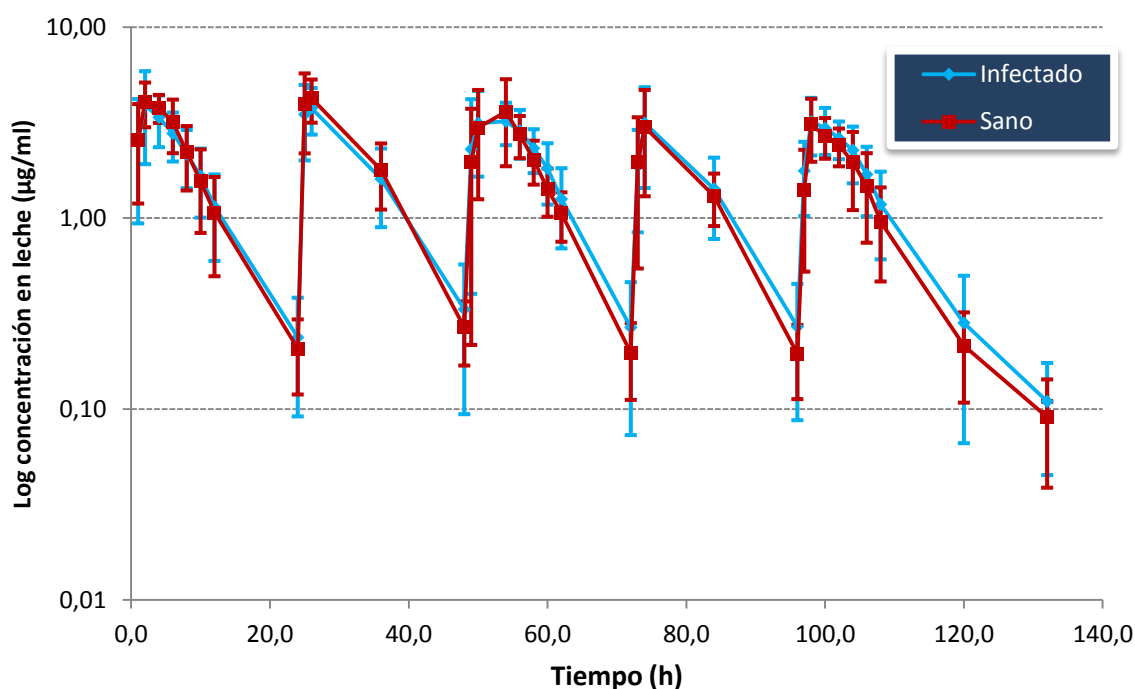


Figura 19: Evolución temporal del logaritmo de las concentraciones de marbofloxacin (media \pm desviación estándar) en leche de medios mamarios infectados y sanos ($n=6$), tras la administración de 10 mg/kg/24h/5d, vía intramuscular, en cabras con mastitis subclínica.

Las concentraciones lácteas de MFX fueron superiores al límite de cuantificación hasta las 36 h posteriores a la última administración, en los medios sanos e infectados. En una cabra las concentraciones de MFX se detectaron hasta las 48 horas, en el medio infectado.

Se sometieron a un análisis farmacocinético no compartimental a los datos de concentración láctea de los medios sanos e infectados, correspondientes a la primera, tercera y quinta administración. Los resultados se muestran en las tablas 39 y 40 (para mayor detalle, se pueden consultar los mismos en el anexo 94 a 97).

4.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE

A los datos de suero y de leche de la dosis múltiple que demostraron cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se les realizó un test de ANOVA por bloques, a los fines de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes administraciones (primera, tercera y quinta) o entre los medios

sanos e infectados, utilizando un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). La prueba de *post hoc* utilizada fue la de diferencia de mínimos cuadrados de Fisher. A aquellos parámetros que no cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se les aplicó un test no paramétrico de Friedman. Los resultados del análisis estadístico en suero y leche se muestran en las tablas 38, 39 y 40, respectivamente.

Los parámetros farmacocinéticos en suero resultaron cumplir con los supuestos del ANOVA en todos los casos analizados. Tras el análisis de los datos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en λ_e , $t_{1/2\lambda_e}$, $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} en la primera administración, respecto a la segunda y tercera (tabla 38), siendo mayores los valores de λ_e , $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} y a su vez menor el de $t_{1/2\lambda_e}$ en la primera administración, respecto a la segunda y tercera.

Por otra parte en leche, los datos de los parámetros farmacocinéticos resultaron cumplir con los supuestos del ANOVA en todos los casos, a excepción de λ_a y C_{max} del medio infectado, los cuales fueron analizados utilizando el test no paramétrico de Friedman. Tras el análisis de los datos, λ_e y $t_{1/2\lambda_e}$ fueron mayores en la quinta administración en comparación con las anteriores para los medios sanos e infectados. Se observaron diferencias en el MRT entre las tres administraciones en los medios sanos, pero no en los infectados (tablas 39 y 40).

Tabla 38: parámetros farmacocinéticos en suero de marbofloxacin, tras una administración a dosis múltiple de 10 mg/kg/día por vía IM en cabras con mastitis subclínica.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 5	Valor p
λ_a	4,13 ± 1,84	6,28 ± 7,07	4,41 ± 3,99	0,633
λ_e	0,13 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,003
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,20 ± 0,09	0,44 ± 0,44	1,24 ± 2,58	0,268
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	5,43 ± 0,77 ^a	7,22 ± 1,75	6,90 ± 1,01	0,010
C_{max} (µg/ml)	9,85 ± 4,18	8,45 ± 2,90	7,46 ± 1,22	0,060
T_{max} (h)	0,58 ± 0,17	0,58 ± 0,44	0,60 ± 0,20	0,966
AUC_{0-t} (µg*h/ml)	43,46 ± 8,32 ^a	34,86 ± 11,88	31,44 ± 4,32	0,005
AUC_{∞} (µg*h/ml)	44,69 ± 8,70 ^a	36,56 ± 12,15	33,15 ± 4,75	0,008
MRT (h)	5,60 ± 1,04	6,59 ± 1,85	6,58 ± 0,95	0,130

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. (^a): indica diferencias significativas entre las administraciones.

Tabla 39: parámetros farmacocinéticos en leche de los medios mamarios sanos, tras una administración de marbofloxacin a dosis múltiple de 10 mg/kg/día por vía IM en cabras con mastitis subclínica.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 5	Valor <i>p</i>
λ_a	0,97 ± 0,48	1,23 ± 1,19	0,90 ± 0,70	0,746
λ_e	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,02 ^a	0,010
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,90 ± 0,46	1,04 ± 0,64	1,19 ± 0,77	0,682
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	5,05 ± 0,93	4,99 ± 0,89	6,89 ± 1,19 ^a	0,012
C_{max} (µg/ml)	4,37 ± 0,78	3,79 ± 1,65	3,43 ± 0,91	0,129
T_{max} (h)	2,57 ± 0,98	4,00 ± 1,15	3,14 ± 2,27	0,083
AUC_{0-t} (µg*h/ml)	38,89 ± 9,58	34,61 ± 11,23	32,66 ± 9,93	0,400
AUC_{∞} (µg*h/ml)	40,43 ± 10,17	36,09 ± 11,31	33,76 ± 10,09	0,356
MRT (h)	7,72 ± 1,08 ^a	8,43 ± 1,47 ^b	9,44 ± 1,48 ^c	0,017

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las administraciones.

Tabla 40: parámetros farmacocinéticos en leche de los medios mamarios enfermos, tras una administración de MFX a dosis múltiple de 10 mg/kg/día por vía IM en cabras con mastitis subclínica.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 5	Valor <i>p</i>
λ_a	0,90 ± 0,45	0,76 ± 0,42	1,79 ± 2,35	0,296
λ_e	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,01 ^a	0,001
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,94 ± 0,41	1,20 ± 0,67	0,87 ± 0,54	0,405
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	5,01 ± 0,83	4,99 ± 1,10	6,94 ± 0,61 ^a	< 0,001
C_{max} (µg/ml)	4,12 ± 1,83	3,70 ± 1,22	4,33 ± 1,78	0,185
T_{max} (h)	2,71 ± 1,25	3,00 ± 1,73	2,68 ± 1,31	0,985
AUC_{0-t} (µg*h/ml)	37,81 ± 10,74	37,89 ± 10,65	36,37 ± 9,01	0,708
AUC_{∞} (µg*h/ml)	39,63 ± 11,41	40,04 ± 11,93	37,63 ± 9,53	0,501
MRT (h)	8,19 ± 1,87	8,75 ± 1,92	9,04 ± 1,12	0,369

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. (^a): indica diferencias significativas entre las administraciones.

Con objeto de evaluar posibles diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre los medios sanos e infectados, se realizó un test de ANOVA por bloques o un test de Friedman, en aquellos casos que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Todos los datos cumplieron con los supuestos, menos el T_{max} de la

primera administración. En ninguno de los parámetros farmacocinéticos analizados, para las tres administraciones, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios sanos e infectados (tabla 41).

Tabla 41: influencia del estado sanitario de la glándula mamaria sobre los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en leche de cabras con mastitis subclínica en las diferentes administraciones del régimen multidosis.

Día	λ_a	λ_e	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T_{max} (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	AUC_{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	MRT (h)
1	0,34	0,94	0,67	0,74	0,36	0,45	0,71	0,79	0,81
3	0,56	0,54	0,45	0,97	0,83	0,09	0,39	0,36	0,25
5	0,40	0,66	0,44	0,92	0,16	0,71	0,34	0,28	0,32

Los resultados se expresan como valor p .

Para el análisis estadístico de los índices farmacocinéticos $AUC_{(0-t)}$ leche/suero, $t_{1/2\lambda_e}$ leche/suero y MRT leche/suero, se comprobó el supuesto de normalidad realizando un test de Shapiro Wilks. Luego se utilizó una prueba t apareada para analizar posibles diferencias entre los parámetros de leche y suero, respectivamente para $AUC_{(0-t)}$, $t_{1/2\lambda_e}$ y MRT, tanto entre las diferentes administraciones como entre los medios sanos e infectados. Este análisis se llevó a cabo para establecer si los valores de los índices farmacocinéticos de MFX en leche presentaban significancia estadística o no. Cuando los datos no demostraron estar normalmente distribuidos, se utilizó el test de Wilcoxon, a los fines de comparar los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

Para el análisis de $AUC_{(0-t)}$ leche/suero de la segunda administración y MRT leche/suero de la tercera administración, se utilizó la prueba de Wilcoxon por no cumplir con el supuesto de normalidad. En el resto de los casos se utilizó un test t apareado para el análisis de los datos.

En las tablas 42 y 43 se muestran los resultados de los parámetros utilizados en el cálculo de los índices leche/suero de cada una de las administraciones en los medios mamarios sanos e infectados, respectivamente. En la tabla 44 se muestran los cocientes de los parámetros farmacocinéticos leche/suero de los medios sanos e infectados para cada una de las administraciones, a los fines de detectar posibles diferencias entre los mismos.

Tabla 42: parámetros farmacocinéticos para el cálculo de los índices leche/suero de marbofloxacin en medios mamarios sanos.

Parámetro	Leche	Suero	Valor <i>p</i>
Día 1			
AUC_(0-t)	38,89 ± 9,58	43,46 ± 8,32	0,143
t_{½le}	5,05 ± 0,93	5,43 ± 0,77	0,482
MRT	7,72 ± 1,08	5,60 ± 1,04	0,005
Día 3			
AUC_(0-t)	34,61 ± 11,23	34,86 ± 11,88	0,955
t_{½le}	4,99 ± 0,89	7,22 ± 1,75	0,041
MRT	8,43 ± 1,47	6,59 ± 1,85	0,031
Día 5			
AUC_(0-t)	32,66 ± 9,93	31,44 ± 4,32	0,649
t_{½le}	6,89 ± 1,19	7,08 ± 1,00	0,652
MRT	9,44 ± 1,48	6,65 ± 1,08	0,002

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Tabla 43: parámetros farmacocinéticos para el cálculo de los índices leche/suero de marbofloxacin en medios mamarios infectados.

Parámetro	Leche	Suero	Valor <i>p</i>
Día 1			
AUC_(0-t)	37,81 ± 10,74	43,46 ± 8,32	0,015
t_{½le}	5,01 ± 0,83	5,43 ± 0,77	0,406
MRT	8,19 ± 1,87	5,60 ± 1,04	0,009
Día 3			
AUC_(0-t)	37,89 ± 10,65	34,86 ± 11,88	0,175
t_{½le}	4,99 ± 1,10	7,22 ± 1,75	0,046
MRT	8,75 ± 1,92	6,59 ± 1,85	0,022
Día 5			
AUC_(0-t)	36,37 ± 9,01	31,44 ± 4,32	0,123
t_{½le}	6,94 ± 0,61	7,08 ± 1,00	0,651
MRT	9,04 ± 1,12	6,65 ± 1,08	0,022

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Tabla 44: índices leche/suero de marbofloxacina entre medios mamarios sanos e infectados.

Parámetro	Medio sano	Medio infectado	Valor <i>p</i>
Día 1			
AUC _(0-t) leche/suero	0,90 ± 0,15	0,86 ± 0,12	0,527
t _{½le} leche/suero	0,95 ± 0,25	0,94 ± 0,22	0,884
MRT leche/suero	1,41 ± 0,30	1,48 ± 0,35	0,501
Día 3			
AUC _(0-t) leche/suero	1,04 ± 0,27	1,12 ± 0,21	0,337
t _{½le} leche/suero	0,73 ± 0,24	0,73 ± 0,24	0,872
MRT leche/suero	1,33 ± 0,32	1,38 ± 0,35	0,329
Día 5			
AUC _(0-t) leche/suero	1,02 ± 0,20	1,15 ± 0,23	0,268
t _{½le} leche/suero	0,98 ± 0,14	0,99 ± 0,12	0,843
MRT leche/suero	1,44 ± 0,26	1,39 ± 0,23	0,301

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL pH LÁCTEO, LA PRODUCCIÓN LÁCTEA Y SU IMPACTO SOBRE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN SUERO Y LECHE

El pH lácteo, la producción láctea total y de cada medio mamario fueron medidos a diario durante toda la experiencia y se utilizó un test de ANOVA por bloques para evaluar posibles diferencias entre los días 1º, 3º y 5º; así como diferencias entre los medios mamarios sanos e infectados.

Los animales comenzaron el estudio con diferencias significativas de producción láctea entre los medios sanos e infectados (*vide supra*). Como se aprecia en la figura 20, no se observaron diferencias estadísticamente significativas de producción láctea entre los medios sanos e infectados en los días 3º y 5º. A lo largo de los cinco días de tratamiento con MFX, la producción láctea correspondiente a los días 3º y 5º se vio incrementada significativamente con respecto a la producción inicial en los medios sanos; por otro lado en los medios infectados la producción láctea del día 5º fue significativamente mayor a la producción inicial, mientras que el día 3º no presentó diferencias con el día 5º ni con la producción inicial.

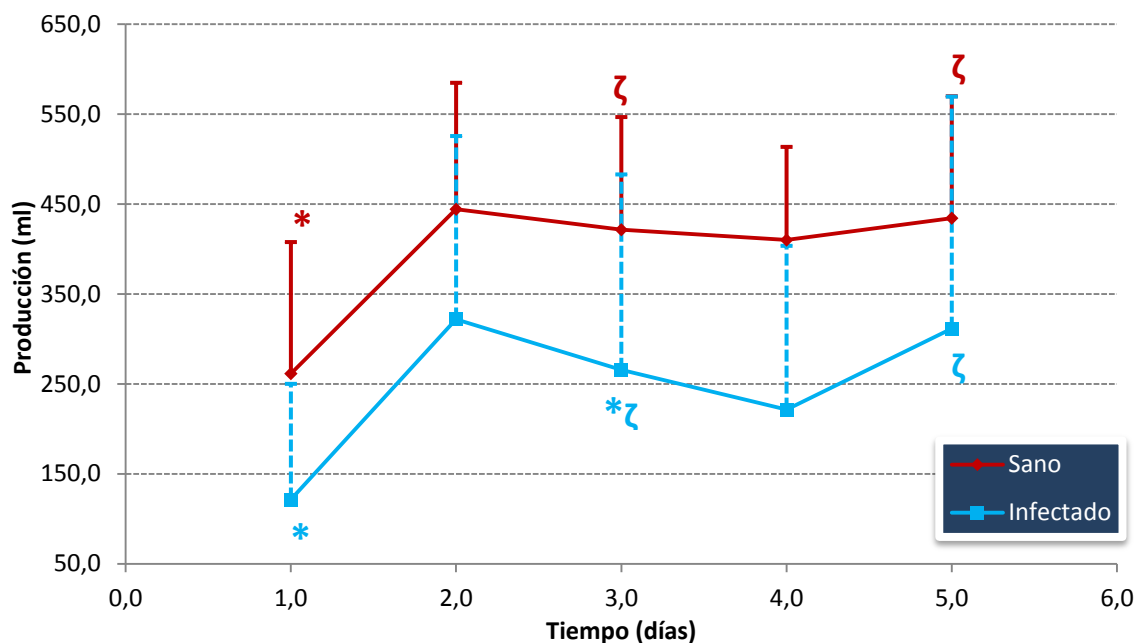


Figura 20: producción láctea diaria en los medios sanos e infectados. Diferentes símbolos del mismo color que la curva indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los días 1º, 3º y 5º en los medios mamarios correspondientes. Los datos se presentan como media y su correspondiente barra de desviación estándar.

Con el fin de evaluar el efecto de la producción láctea sobre los parámetros de MFX en suero y leche, se realizó un test de correlación entre la producción láctea total o bien de cada medio mamario (para los datos de suero o leche, respectivamente), y los parámetros farmacocinéticos para cada animal. Se utilizó un test de correlación de Pearson para los datos normales y el test de Spearman para los datos que no mostraron normalidad tras la realización de una prueba de Shapiro Wilks. En la tabla 45 se muestran los resultados de los análisis de correlación.

En suero, la producción láctea se relacionó de manera directamente proporcional con λ_e y $t_{1/2\lambda_e}$, mientras que se relacionó de manera inversamente proporcional con las $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} .

Con respecto a los parámetros farmacocinéticos en leche, la producción láctea se relacionó de manera inversamente proporcional a las $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} en los medios sanos pero no mostró presentar una relación significativa con ningún parámetro farmacocinético en los medios infectados.

Tabla 45: valores de significancia (p) correspondientes a las pruebas de correlación entre la producción láctea y los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en suero y leche tras un régimen de dosis múltiple por vía IM de 10 mg/kg/día en cabras con mastitis subclínica.

Parámetro	Suero	Leche	
		Sano	Infectado
λ_a	0,65	0,42	0,78
λ_e	0,04 ^a	0,07	0,77
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,84	0,72	0,69
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	0,02 ^a	0,22	0,95
C_{max} (μg/ml)	0,54	0,41	0,66
T_{max} (h)	0,46	0,90	0,45
AUC_{0-t} (μg*h/ml)	0,05 ^a	0,01 ^a	1,00
AUC_{∞} (μg*h/ml)	0,05 ^a	0,01 ^a	0,88
MRT (h)	0,75	0,81	0,30

(^a): indica una correlación significativa entre la producción láctea y el parámetro farmacocinético.

Con respecto al pH lácteo, los animales iniciaron el estudio con diferencias significativas entre los medios sanos e infectados (*vide supra*: sección material y métodos). No se observaron diferencias entre los medios mamarios sanos e infectados en los días 3º y 5º (tabla 46). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el pH lácteo entre los diferentes días en los medios mamarios sanos. Por el contrario, el pH fue significativamente menor en el día 1º con respecto a los días 3º y 5º en los medios mamarios infectados.

Tabla 46: evolución del pH lácteo a lo largo del tratamiento con marbofloxacin para medios sanos e infectados.

Medio	Día 1	Día 3	Día 5	P
Sano	6,57 ± 0,03	6,54 ± 0,07	6,57 ± 0,03	0,257
Infectado	6,72 ± 0,04 ^a	6,58 ± 0,07	6,60 ± 0,07	< 0,001

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. (^a): indica diferencia significativa con respecto al resto de los días.

4.7. CÁLCULO DE ÍNDICES DE EFICACIA DE LA DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR

Los índices de eficacia C_{\max}/CIM y $\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$ correspondientes al régimen posológico de dosis múltiple de MFX, a razón de 10 mg/kg/día por vía IM, se muestran en las tablas 47, 48 y 49. Fueron utilizadas las CIM_{90} y CIM_{99} procedentes de las cepas regionales de ECN y *S. aureus* productores de mastitis subclínica.

Tabla 47: índices de eficacia antimicrobiana C_{\max}/CIM y $\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$ para marbofloxacin. Día 1º.

Índice PK/PD	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	13,35	13,01	14,34	11,90	5,27	5,94	5,14	9,85 \pm 4,18
C_{\max}/CIM								
C_{\max}/CIM_{90} (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	33,37	32,53	35,86	29,75	13,17	14,85	12,85	24,63 \pm 10,46
C_{\max}/CIM_{99} (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	16,69	16,26	17,93	14,87	6,59	7,43	6,42	12,31 \pm 5,23
$\text{AUC}_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	52,45	54,32	41,55	46,96	41,81	32,66	34,46	43,46 \pm 8,32
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$								
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{90}$ (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	131,14	135,80	103,88	117,41	104,52	81,65	86,14	108,65 \pm 20,80
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{99}$ (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	65,57	67,90	51,94	58,70	52,26	40,82	43,07	54,32 \pm 10,40

DS: desviación estándar.

Tabla 48: índices de eficacia antimicrobiana C_{\max}/CIM y $\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$ para marbofloxacin. Día 3º.

Índice PK/PD	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	12,69	9,30	9,76	10,64	6,17	5,61	4,98	8,45 \pm 2,90
C_{\max}/CIM								
C_{\max}/CIM_{90} (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	31,74	23,25	24,40	26,60	15,44	14,02	12,45	21,13 \pm 7,26
C_{\max}/CIM_{99} (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	15,87	11,63	12,20	13,30	7,72	7,01	6,23	10,56 \pm 3,63
$\text{AUC}_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	48,54	41,03	31,05	49,87	30,87	21,33	21,32	34,86 \pm 11,88
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$								
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{90}$ (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	121,36	102,57	77,63	124,67	77,17	53,33	53,31	87,15 \pm 29,71
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{99}$ (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	60,68	51,28	38,82	62,33	38,59	26,67	26,66	43,57 \pm 14,85

DS: desviación estándar.

Tabla 49: índices de eficacia antimicrobiana C_{\max}/CIM y $\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$ para marbofloxacin. Día 5º.

Índice PK/PD	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	8,85	8,14	8,40	7,96	7,10	6,20	5,53	7,46 \pm 1,22
C_{\max}/CIM								
C_{\max}/CIM_{90} (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	22,14	20,35	21,01	19,90	17,74	15,51	13,83	18,64 \pm 3,06
C_{\max}/CIM_{99} (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	11,07	10,17	10,50	9,95	8,87	7,75	6,92	9,32 \pm 1,53
$\text{AUC}_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	31,03	31,64	28,38	39,07	32,85	32,15	24,99	31,44 \pm 4,32
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}$								
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{90}$ (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	77,59	79,09	70,95	97,68	82,11	80,38	62,48	78,61 \pm 10,80
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{99}$ (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	38,79	39,54	35,47	48,84	41,06	40,19	31,24	39,31 \pm 5,40

DS: desviación estándar.

Los indicadores de prevención de selección de mutantes C_{\max}/CPM_{90} , $\text{AUC}_{(0-t)}/\text{CIM}_{90}$ y T_{MSW} , fueron calculados utilizando datos de CPM para *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas con CIM_{90} de 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MPC_{90} de 1,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y una cepa control ATCC 29213 con CIM_{90} de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MPC_{90} de 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fernández-Palacios, 2013), otra cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con CIM_{90} de 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MPC_{90} de 3,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Wetzstein *et al.*, 2005) y una cepa de *Staphylococcus intermedius* con CIM_{90} de 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MPC_{90} de 3,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Awji *et al.*, 2012) procedentes de la bibliografía. Los resultados del análisis se exponen en las tablas 50 y 55.

Tabla 50: Indicadores de prevención de selección de mutantes C_{\max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ calculados a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM a dosis múltiple) y MPC bibliográficas. Día 1º.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	13,35	13,01	14,34	11,90	5,27	5,94	5,14	10,64 \pm 3,98
C_{\max}/MPC_{90}								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)	3,81	3,72	4,10	3,40	1,51	1,70	1,47	3,04 \pm 1,14
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 52$)	4,05	3,94	4,35	3,61	1,60	1,80	1,56	3,22 \pm 1,21
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 12$)	13,35	13,01	14,34	11,90	5,27	5,94	5,14	10,64 \pm 3,98
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)	26,70	26,02	28,69	23,80	10,54	11,88	10,28	21,27 \pm 7,96
$AUC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	52,45	54,32	41,55	46,96	41,81	32,66	34,46	43,46 \pm 8,32
$AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)	14,99	15,52	11,87	13,42	11,95	9,33	9,84	12,42 \pm 2,38
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 52$)	15,90	16,46	12,59	14,23	12,67	9,90	10,44	13,17 \pm 2,52
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 12$)	52,45	54,32	41,55	46,96	41,81	32,66	34,46	43,46 \pm 8,32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)	104,91	108,64	83,10	93,92	83,62	65,32	68,91	86,92 \pm 16,64

DS: desviación estándar. Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Tabla 51: Indicadores de prevención de selección de mutantes C_{\max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ calculados a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM a dosis múltiple) y MPC bibliográficas. Día 3º.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	12,69	9,30	9,76	10,64	6,17	5,61	4,98	9,03 \pm 2,70
C_{\max}/MPC_{90}								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	3,63	2,66	2,79	3,04	1,76	1,60	1,42	2,58 \pm 0,77
MPC ₉₀ = 3,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)								
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b	3,85	2,82	2,96	3,22	1,87	1,70	1,51	2,74 \pm 0,82
MPC ₉₀ = 3,30 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 52$)								
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c	12,69	9,30	9,76	10,64	6,17	5,61	4,98	9,03 \pm 2,70
MPC ₉₀ = 1,00 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 12$)								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c	25,39	18,60	19,52	21,28	12,35	11,22	9,96	18,06 \pm 5,40
MPC ₉₀ = 0,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)								
$AUC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	48,54	41,03	31,05	49,87	30,87	21,33	21,32	34,86 \pm 11,88
$AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	13,87	11,72	8,87	14,25	8,82	6,10	6,09	9,96 \pm 3,39
MPC ₉₀ = 3,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)								
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b	14,71	12,43	9,41	15,11	9,35	6,46	6,46	10,56 \pm 3,60
MPC ₉₀ = 3,30 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 52$)								
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c	48,54	41,03	31,05	49,87	30,87	21,33	21,32	34,86 \pm 11,88
MPC ₉₀ = 1,00 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 12$)								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c	97,09	82,05	62,11	99,74	61,74	42,67	42,65	69,72 \pm 23,76
MPC ₉₀ = 0,50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=1$)								

DS: desviación estándar. Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Tabla 52: Indicadores de prevención de selección de mutantes PK/PD C_{\max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ calculados a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras la administración IM a dosis múltiple) y MPC bibliográficas. Día 5º.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
C_{\max}	8,85	8,14	8,40	7,96	7,10	6,20	5,53	7,78 \pm 0,97
C_{\max}/MPC_{90}								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 μ g/ml (<i>n</i> =1)	2,53	2,33	2,40	2,27	2,03	1,77	1,58	2,22 \pm 0,28
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 μ g/ml (<i>n</i> = 52)	2,68	2,47	2,55	2,41	2,15	1,88	1,68	2,36 \pm 0,29
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 μ g/ml (<i>n</i> = 12)	8,85	8,14	8,40	7,96	7,10	6,20	5,53	7,78 \pm 0,97
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 μ g/ml (<i>n</i> =1)	17,71	16,28	16,81	15,92	14,20	12,40	11,07	15,55 \pm 1,93
$AUC_{(0-t)}$ (μg*h/ml)	31,03	31,64	28,38	39,07	32,85	32,15	24,99	31,44 \pm 4,32
$AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 μ g/ml (<i>n</i> =1)	8,87	9,04	8,11	11,16	9,38	9,19	7,14	8,98 \pm 1,23
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 μ g/ml (<i>n</i> = 52)	9,40	9,59	8,60	11,84	9,95	9,74	7,57	9,53 \pm 1,31
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 μ g/ml (<i>n</i> = 12)	31,03	31,64	28,38	39,07	32,85	32,15	24,99	31,44 \pm 4,32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 μ g/ml (<i>n</i> =1)	62,07	63,27	56,76	78,14	65,69	64,30	49,98	62,89 \pm 8,64

DS: desviación estándar. Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Tabla 53: Indicador de prevención de selección de mutantes T_{MSW} , calculado a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (administración IM a dosis múltiple) y MPC bibliográficas. Día 1º.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 µg/ml (n=1)	10,17 (42)	14,07 (59)	6,98 (29)	9,88 (41)	17,32 (72)	11,45 (48)	14,54 (61)	12,06 \pm 3,47 (50 \pm 14)
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 µg/ml (n = 52)	10,07 (42)	13,77 (57)	6,88 (29)	9,68 (40)	17,11 (71)	10,94 (46)	14,17 (59)	11,80 \pm 3,42 (49 \pm 14)
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 µg/ml (n = 12)	6,61 (28)	7,31 (30)	3,11 (13)	4,91 (20)	6,52 (27)	4,92 (21)	6,33 (26)	5,68 \pm 1,44 (24 \pm 6)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 µg/ml (n=1)	6,91 (29)	4,81 (20)	7,11 (30)	7,11 (30)	3,21 (13)	6,41 (27)	4,51 (19)	5,72 \pm 1,55 (24 \pm 6)

DS: desviación estándar. NC: no cuantificable. Los resultados se expresan en horas (% del intervalo de dosis dentro de la MSW). Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Tabla 54: Indicador de prevención de selección de mutantes PK/PD T_{MSW} calculado a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin tras la administración IM a dosis múltiple y MPC bibliográficas. Día 3.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 µg/ml (n=1)	5,68 (24)	5,87 (24)	4,84 (20)	6,07 (25)	20,33 (85)	11,45 (48)	11,71 (49)	9,42 \pm 5,58 (39 \pm 23)
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 µg/ml (n = 52)	5,47 (23)	5,56 (23)	4,64 (19)	5,85 (24)	20,22 (84)	11,39 (47)	11,69 (49)	9,26 \pm 5,65 (39 \pm 24)
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 µg/ml (n = 12)	2,11 (9)	2,01 (8)	1,41 (6)	3,13 (13)	7,24 (30)	2,05 (9)	2,55 (11)	2,93 \pm 1,97 (12 \pm 8)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 µg/ml (n=1)	8,21 (34)	6,91 (29)	2,70 (11)	9,51 (40)	2,62 (11)	7,92 (33)	7,72 (32)	6,51 \pm 2,74 (27 \pm 11)

DS: desviación estándar. NC: no cuantificable. Los resultados se expresan en horas (% del intervalo de dosis dentro de la MSW). Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c). Los datos que figuran entre paréntesis corresponden a los porcentajes del intervalo de dosis que se encuentra en la ventana de selección de mutantes (MSW).

Tabla 55: Indicador de prevención de selección de mutantes T_{MSW} , calculado a partir de los datos farmacocinéticos de marbofloxacin (tras administración IM a dosis múltiple) y MPC bibliográficas. Día 5º.

Microorganismo	Animal							Media \pm DS
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a MPC ₉₀ = 3,50 µg/ml (<i>n</i> =1)	8,22 (34)	7,84 (33)	5,95 (25)	16,65 (69)	15,17 (63)	9,98 (42)	10,45 (44)	10,61 \pm 3,93 (44 16)
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> WT ^b MPC ₉₀ = 3,30 µg/ml (<i>n</i> = 52)	7,91 (33)	7,63 (32)	5,79 (24)	16,39 (68)	15,16 (63)	7,77 (32)	10,13 (42)	10,11 \pm 4,09 (42 \pm 17)
<i>Staphylococcus aureus</i> mastitis caprina ^c MPC ₉₀ = 1,00 µg/ml (<i>n</i> = 12)	3,67 (15)	3,62 (15)	3,27 (14)	8,58 (36)	5,76 (24)	1,76 (7)	3,32 (14)	4,28 \pm 2,23 (18 \pm 9)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 ^c MPC ₉₀ = 0,50 µg/ml (<i>n</i> =1)	8,21 (34)	8,51 (35)	3,01 (13)	3,36 (14)	5,92 (25)	7,13 (30)	4,68 (20)	5,83 \pm 2,23 (24 \pm 9)

DS: desviación estándar. NC: no cuantificable. Los resultados se expresan en horas (% del intervalo de dosis dentro de la MSW). Wetzstein *et al.*, 2005 (^a); Awji *et al.*, 2012 (^b); Fernández-Palacios, 2013(^c).

Todos los animales finalizaron el estudio con cultivos negativos en ambos medios mamarios. Cinco animales mostraron cultivos bacterianos negativos al cuarto día de tratamiento, mientras que los otros dos animales lo hicieron al quinto día.

V. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. MATERIAL

5.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo de esta tesis se siguieron las recomendaciones establecidas en las siguientes directivas: guía para la realización de estudios farmacocinéticos en especies animales (EMEA/CVMP/133/99-FINAL, 1999), guía para la realización de estudios de bioequivalencia de medicamentos veterinarios (EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL, 2000) y guía de seguridad en animales para los productos farmacéuticos veterinarios (VICH, 2008).

Estos instructivos incluyen, entre otras consideraciones que se tuvieron en cuenta en la metodología, los aspectos relacionados a las características de los animales, contemplando la especie, edad, raza, sexo, estado productivo, así como las condiciones a seguir por los principios de bienestar animal, utilizando el mínimo número de individuos en los ensayos experimentales, según el principio de las “3R” (reducción, reemplazo y refinamiento). Igualmente se contemplan los estudios de sanidad de la glándula mamaria, así como aquellos aspectos relacionados con las condiciones que se deben seguir para desarrollar estudios comparativos de diferentes rutas de administración y modelos animales con mastitis. De tal modo que los resultados pudieran ser válidos y ser comparados con otros.

Al inicio del estudio de MFX a dosis múltiple en cabras con mastitis subclínica, los medios mamarios infectados presentaron un nivel de producción láctea y pH lácteo significativamente menores que los medios sanos; mientras que el RCS resultó significativamente mayor en los medios mamarios enfermos que en los sanos. Esto, sumado al diagnóstico microbiológico de ECN en todos los medios infectados, permitió llegar al diagnóstico de mastitis subclínica en los medios infectados.

5.1.2. FÁRMACOS, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para la utilización de las moléculas empleadas se siguieron las instrucciones que cada laboratorio recomienda para su almacenamiento y manipulación.

Periódicamente se realizaron controles de mantenimiento, calibrado y limpieza del equipamiento utilizado para la detección y procesamiento de las muestras según las

recomendaciones de diferentes instructivos que se basan en las “Buenas Prácticas de Laboratorio” (GLP, 2004; VICH, 2000).

De esta manera se procuró asegurar la máxima calidad de los productos utilizados y del material empleado.

5.2. DISCUSIÓN DEL MÉTODO

5.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS ESTUDIOS DE DOSIS ÚNICA Y DOSIS MÚLTIPLE

5.2.1.1. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA

La dosis seleccionada para el estudio farmacocinético de dosis únicas, en cabras lactantes sanas, por vía IV e IM, fue de 5 mg/kg. Como se expuso anteriormente, la dosis de MFX recomendada, en diferentes especies de rumiantes, es de 2 mg/kg (Shem Tov *et al.*, 1997; Waxman *et al.*, 2001; Ismail y El-Kattan, 2007; Schneider *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2010a; Sidhu *et al.*, 2010b; Sidhu *et al.*, 2011; Belew *et al.*, 2015). Con estas dosis se cumplen adecuadamente los criterios de eficacia para la mayoría de las bacterias Gramnegativas, sin embargo, los parámetros farmacocinéticos reportados en estos estudios, indican que no se alcanzarían los requerimientos de eficacia PK/PD para patógenos Grampositivos. Rubio (2010) ensayó una dosis de 5 mg/kg de MFX en llamas, sin observar efectos indeseables, por lo que decidimos emplear la misma dosis, para alcanzar mayores concentraciones séricas de MFX y de esa manera mejorar los valores de los índices PK/PD para patógenos Grampositivos, causantes de mastitis en cabras.

El preparado de MFX seleccionado para realizar los estudios fue Marbocyl® 10%. Si bien existen otras formulaciones de MFX al 2% o al 1%, se decidió utilizar esta formulación para evitar la administración de grandes volúmenes de solución inyectable a los animales, principalmente por una razón de bienestar animal, puesto que la inyección IM o SC de MFX se asocia con dolor e inflamación en el sitio de administración.

Las vías de administración seleccionadas en el estudio a dosis única fueron la IV e IM. La vía IV se seleccionó con la finalidad de definir el comportamiento farmacocinético de MFX en cabras lactantes. En la cinética descriptiva, algunos parámetros, como el V_d y V_{ss} y el Cl, son representativos únicamente tras la administración IV (Toutain 2004a; Toutain 2004b). A su vez, la vía IV permite servir de parámetro (100%) para calcular la biodisponibilidad sérica de otras vías extravasculares. En este caso, la vía extravascular

seleccionada fue la IM, ya que es una vía que presenta en general una buena biodisponibilidad en diferentes especies de rumiantes (tabla 8) y es una vía de uso habitual en la práctica clínica, en la terapia con ATMs. A partir de los datos farmacocinéticos obtenidos tras la administración IM se realizó un análisis PK/PD y se calculó mediante simulación, la dosis a administrar en el protocolo de dosis múltiple en cabras enfermas.

El estudio farmacocinético de dosis única, se desarrolló mediante un diseño cruzado, para minimizar la variabilidad debida a diferencias individuales en el metabolismo y eliminación del fármaco, al estudiarse en los mismos animales ambas vías (muestras pareadas). De esta manera, el tratamiento estadístico de los datos permite disminuir el tamaño muestral, sin afectar en gran medida la potencia del test estadístico utilizado, de acuerdo a los criterios de las “3R” recomendados desde el punto de vista bioético para el diseño de ensayos con animales. El período de lavado entre cada experiencia (dos semanas) fue superior al recomendado: 4 a 8 semividas de eliminación (EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL, 2000).

5.2.1.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE

La dosis utilizada en el estudio farmacocinético de dosis múltiple, en cabras con mastitis subclínica, fue de 10 mg/kg/día. La dosis se definió mediante predicción PK/PD. De esta manera, la dosis seleccionada fue la que cumpliría con los criterios de eficacia PK/PD para fluoroquinolonas. La MFX fue administrada cada 24 horas, ya que sus características farmacocinéticas lo permiten, dada su prolongada semivida de eliminación en comparación con otras fluoroquinolonas (Waxman *et al.*, 2001). Por otra parte, la administración cada 24 horas presenta ventajas prácticas desde el punto de vista terapéutico, ya que es más complicado dosificar con frecuencias mayores en condiciones de campo. El preparado comercial utilizado fue Marbocyl® 10%, por las mismas razones expuestas en el apartado anterior.

Con respecto al diseño experimental del estudio farmacocinético de un régimen de dosis múltiple, el esquema posológico propuesto fue de cinco días de duración, a fin de abarcar más de tres semividas de eliminación, conforme a lo recomendado por las Buenas Prácticas Clínicas y de Laboratorio (VICH, 1998; GLP, 2004). Por otra parte, esta duración del tratamiento, incrementaba las probabilidades de curación microbiológica.

5.2.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICA Y MICROBIOLÓGICA

Existen diversas técnicas analíticas para detectar y cuantificar fluoroquinolonas en suero, leche u otras matrices: la absorción molecular, la espectrofluorometría, la espectrometría de masas y la electroforesis capilar, entre otras. Siendo una de las más frecuentes para estudios farmacocinéticos la cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography o HPLC), tal como se describe en numerosas fuentes bibliográficas (Bregante *et al.*, 1999; Anadón *et al.*, 2001; Bermingham *et al.*, 2002; Bousquet-Melou *et al.*, 2002; Carretero *et al.*, 2002; Bidgood y Papich, 2005; Davis *et al.*, 2007; Dimitrova *et al.*, 2007; de Lucas *et al.*, 2008; Abo-El-Sooud *et al.*, 2009; Cárceles *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2009). La técnica microbiológica de difusión en agar (Bennett *et al.*, 1966) es otra técnica empleada habitualmente. Se ha demostrado que existe en general, y concretamente para la MFX, una buena correlación entre los resultados de la técnica Bennett con los obtenidos mediante HPLC (Lorenzutti, 2009). Únicamente debería utilizarse con antimicrobianos que no produzcan metabolitos activos, como es el caso de la MFX, ya que con la técnica microbiológica sólo se logra caracterizar la actividad antimicrobiana y no el compuesto *per se* (Cester *et al.*, 1996; McKellar *et al.*, 1999).

En el presente estudio se utilizaron dos técnicas:

- 1) La técnica de HPLC, descrita por Waxman *et al.* (2001), para la detección y cuantificación de MFX en muestras de suero y leche, procedentes del estudio de dosis única por vías IV e IM.
- 2) El método microbiológico, según la técnica descrita por Lorenzutti (2009) para la detección y cuantificación de MFX en las muestras de suero y leche, procedentes del estudio a dosis múltiple, vía IM, en cabras con mastitis subclínica.

Ambas fueron validadas. Los resultados obtenidos, tanto la técnica cromatográfica como la microbiológica para MFX en suero y leche de cabra, demostraron que son exactas y precisas para la cuantificación de MFX. Conforme a los requisitos de las normativas de validación GL 2, del programa VICH (1998), así como también los incluidos en los procedimientos de validación para métodos bioanalíticos, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, de la Agencia Europea del Medicamento (2009).

Cabe destacar que no se procedió al cálculo del índice de recuperación de MFX en suero y leche, debido a que la técnica extractiva y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que ensayamos previamente para la cuantificación de MFX en plasma de cabra (Lorenzutti, 2009). Los límites de cuantificación (LC) de la técnica cromatográfica, para las muestras de suero y leche, fueron de 0,025 µg/ml. Similares a los obtenidos por Waxman *et al.* (2001), que refieren una recuperación del 90,57 % y un LC de 0,017 µg/ml. Los LC obtenidos para el método microbiológico fueron de 0,049 µg/ml para las muestras de suero y 0,098 µg/ml para las de leche.

Es importante considerar que estos valores se encuentran por debajo de las concentraciones inhibitorias mínimas de los patógenos más frecuentes productores de mastitis caprinas. Conforme a los datos consultados en la bibliografía y de sensibilidad de los microorganismos regionales (*vide supra*), los ECN y *S. aureus* presentan CIM₉₀ entre 0,20 y 0,40 µg/ml (Meunier *et al.*, 2004).

5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE MARBOFLOXACINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA CAPRINA

Tras el análisis de 106 cepas de ECN, los valores calculados de CIM₉₀ y CIM₉₉ fueron de 0,40 y 0,80 µg/ml, respectivamente; estando la CIM₅₀ en un valor intermedio entre los 0,20 y 0,40 µg/ml. Valores similares fueron reportados para ECN con una CIM₅₀ de 0,25 µg/ml y CIM₉₀ de 1,00 µg/ml, aisladas mastitis bovinas (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015). El índice entre la CIM₉₀/CIM₅₀ en este estudio fue de 2. La cercanía entre los valores de la CIM₅₀, CIM₉₀, e incluso de la CIM₉₉, sugiere que, en la región estudiada, aún no se han evidenciado cepas de ECN con mecanismos de resistencia adquirida. Puesto que el incremento del valor de la razón CIM₉₀/CIM₅₀, se relaciona directamente con el desarrollo de mecanismos de resistencias en la población bacteriana (Higgins *et al.*, 2000), debido a la presión terapéutica. Este efecto también se puede observar en la figura 14, donde los porcentajes de cepas inhibidas por la MFX en función de la CIM describen una distribución unimodal, a diferencia de las bimodales (donde se observan subpoblaciones intermedias) concomitantes con la evolución de mecanismos de resistencia (Bywater *et al.*, 2006; MacGowan y Wise, 2001).

Se podría llegar a conclusiones similares con las 8 cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas, donde el 50% presentó una CIM de 0,20 µg/ml (correspondiente a la CIM₅₀) y

el otro 50% una CIM de 0,40 µg/ml (correspondiente a la CIM₉₀). Aunque el escaso número de cepas aisladas impide profundizar en tal análisis, estos valores de CIM están en concordancia con los datos de sensibilidad obtenidos por Fernández-Palacios (2013). Quien obtiene una CIM₅₀ de 0,12 µg/ml y una CIM₉₀ de 0,50 µg/ml en 12 cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de mastitis caprinas. Si los contrastamos con datos procedentes de otras especies, nuestros valores son similares a los publicados por diferentes autores para *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovinas, con CIM₅₀ de 0,25 µg/ml y CIM₉₀ de 0,50 µg/ml (Meunier *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015)

5.4. MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS ÚNICA EN ANIMALES SANOS

5.4.1. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO

5.4.1.1. MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAVENOSA

La administración de una dosis IV de MFX de 5 mg/kg a cabras adultas lactantes, muestra un perfil farmacocinético similar al observado en el trabajo de Waxman *et al.* (2001), con cabras adultas no lactantes.

Los valores de AUC_(0-t) ($20,12 \pm 7,66$ µg*h/ml) y AUC_∞ ($20,63 \pm 7,50$ µg*h/ml), están en concordancia con los datos publicados. Si bien, puede dar la falsa apariencia de ser superiores a estos, debido a que la dosis administrada en nuestro estudio (5 mg/kg) es 2,5 veces superior a la empleada por estos autores. Waxman *et al.* (2001) obtienen AUC_(0-t) de $8,28 \pm 1,40$ y AUC_∞ $8,44 \pm 1,42$ µg*h/ml, tras administración de 2 mg/kg vía IV a cabras adultas no lactantes. Fernández-Palacios (2013), presenta AUC_(0-t) y AUC_∞ de $7,02 \pm 1,32$ y $7,02 \pm 1,32$ µg*h/ml, respectivamente, tras administración IV de 2 mg/kg, en cabras lactantes. El AUC es un parámetro que varía proporcionalmente a la dosis administrada, reflejando la cantidad total de fármaco presente en el organismo (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c). De esta manera, los resultados de AUC son consistentes con la dosis utilizada en el presente estudio.

Los volúmenes aparentes de distribución observados tras la administración IV fueron de $1,42 \pm 0,45$ L/kg (V_d) y $1,05 \pm 0,24$ L/kg (V_{ss}). Esto sugeriría una buena distribución tisular de la MFX en cabras. Los valores obtenidos son similares a los de Waxman *et al.* (2001), en cabras no lactantes (V_{ss} de $1,31 \pm 0,15$ L/kg) y ligeramente diferente de los referidos por Fernández-Palacios (2013) en cabras lactantes V_d de $2,57 \pm 0,87$ L/kg

(superior) y V_{ss} $0,85 \pm 0,20$ L/kg (ligeramente inferior). Aunque los datos sugerirían que el V_{ss} es menor en cabras en lactación, los hallazgos de Haritova *et al.* (2003) defienden la tesis contraria, pues observan diferencias para enrofloxacin entre grupos de ovejas lactantes y no lactantes, siendo el V_{ss} mayor en las primeras. Dichas diferencias podrían ser debidas a cambios en la distribución de los fármacos en los diferentes territorios orgánicos y/o a diferencias concomitantes en su CI (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a).

Los valores de V_d están en concordancia con los observados en otras especies, como vacas, cabras, ovejas, caballos, perros y gatos (tabla 10).

En la tabla 42 se puede apreciar que la mayoría de las fluoroquinolonas estudiadas en rumiantes lactantes presentaron, en general, valores de V_d y V_{ss} superiores a la unidad, lo que indica una buena distribución en el organismo (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b). En cabras, MFX presentó un V_{ss} mayor que el reportado en ovejas y menor que el de las vacas. Por otra parte, en ovejas y vacas la MFX presentó un V_{ss} menor que el descrito para danofloxacin y enrofloxacin. En la misma tabla, y específicamente en relación a caprinos lactantes, se puede apreciar que los volúmenes de distribución de MFX resultaron ser menores que los publicados para danofloxacin, ibafloxacin y pefloxacin, mientras que fue similar al reportado para orbifloxacin y mayor a levofloxacin y moxifloxacin.

Los V_d expresan el grado de distribución en el organismo, y se encuentran relacionados con la capacidad de difusión de las fluoroquinolonas hacia los tejidos y secreciones. Las fluoroquinolonas alcanzan concentraciones en la mayoría de los tejidos, al menos iguales que las alcanzadas en sangre, si bien en algunos casos pueden acumularse en tejidos como pulmón y secreciones bronquiales, próstata y leche (EMEA, 2000; Walker y Dowling, 2006; González Gómez y Nieto Matínez, 2007; USP, 2007; Papich y Riviere, 2009; Guiguère y Dowling, 2013).

El principal mecanismo de distribución tisular de estos ATMs se produce mediante difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración entre la sangre y los diferentes tejidos del organismo, que responde a la ley de Fick. Este fenómeno se ve favorecido por las características físico-químicas de los representantes del grupo, como son su gran liposolubilidad y su carácter anfótero, que les permite atravesar fácilmente membranas biológicas. De esta manera, el carácter liposoluble del grupo explicaría en gran medida su amplia distribución en el organismo. De todas formas, existen otros factores, como el

bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y el fenómeno de trampa iónica (atrapamiento en función del pH), documentado en algunas fluoroquinolonas (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c), que determinan la acumulación del fármaco en distintos tejidos o secreciones del organismo.

Tabla 56: Volúmenes de distribución (V_{ss} y V_d) informados para diferentes fluoroquinolonas en especies de rumiantes domésticos en lactación.

Especie	Fluoroquinolona	V_{ss} (L/kg)	V_d (L/kg)
Cabras	Danofloxacin ^f	$2,43 \pm 0,13$	$7,81 \pm 0,97$
	Gatifloxacin ^j	-	$3,92 \pm 0,69$
	Ibafloxacin ^g	$1,65 \pm 0,42$	$5,86 \pm 0,85$
	Levofloxacin ⁱ	$0,73 \pm 0,22$	-
	Moxifloxacin ^e	$0,79 \pm 0,08$	$1,44 \pm 0,30$
	Orbifloxacin ^h	$1,13 \pm 0,08$	-
	Pefloxacin ^c	$5,14 \pm 0,21$	-
Ovejas	Danofloxacin ^f	$2,19 \pm 0,18$	$3,81 \pm 0,41$
	Enrofloxacin ^d	$2,82 \pm 0,21$	$2,91 \pm 0,17$
	Marbofloxacin ^a	$0,60 \pm 0,10$	-
Vacas	Danofloxacin ^b	$2,04 \pm 1,10$	-
	Marbofloxacin ^a	$1,50 \pm 0,30$	-

Shem-Tov *et al.*, 1997^a (^a); Shem-Tov *et al.*, 1998 (^b); Abd-El-Aty y Goudah, 2002 (^c); Haritova *et al.*, 2003 (^d); Fernández Varón *et al.*, 2006 (^e); Escudero *et al.*, 2007 (^f); Marín *et al.*, 2007a (^g); Marín *et al.*, 2007b (^h); Goudah y Abo-El-Sooud (ⁱ), 2008; Singh *et al.*, 2010 (^j).

En relación a los parámetros de eliminación, la MFX presentó en cabras lactantes un Cl ligeramente mayor ($0,27 \pm 0,09$ L/kg/h) que en cabras adultas no gestantes ($Cl = 0,23$ L/kg/h; Waxman *et al.*, 2001) y muy similar al reportado por Fernández-Palacios (2013) de $0,29 \pm 0,05$ L/kg/h. Estos hallazgos son consistentes con el efecto que la lactación presentaría sobre el Cl de la MFX, ya que en estos animales la eliminación del fármaco a través de la leche se hace relevante. A su vez, la $t_{1/2\lambda_e}$ obtenida en nuestro trabajo para la vía IV ($3,82 \pm 0,99$ h) fue menor a la observada en los estudios de Waxman *et al.* (2001) $t_{1/2\lambda_e}$ $7,18 \pm 0,19$ h y de Fernández-Palacios (2013) $t_{1/2\lambda_e}$ de 5,61 h (media armónica, no se reportó DS). Las diferencias entre los tres estudios podrían ser debidas a un efecto de la lactación sobre el Cl en cabras. En concordancia con el estudio de Marín

et al. (2007a) con ibafloxacin en cabras lactantes, que observó la misma diferencia en los parámetros de eliminación $t_{1/2\lambda e}$ y Cl. Lo que apoyaría la hipótesis de una posible influencia de la lactación sobre el comportamiento cinético de las fluoroquinolonas en esta especie. Posteriormente, en el apartado de farmacocinética de MFX en leche, analizaremos los factores que podrían explicar estas diferencias en la $t_{1/2\lambda e}$ y el Cl en animales lactantes. En cuanto al tiempo de permanencia, el MRT observado en nuestro estudio fue de $4,14 \pm 1,15$ h, similar al observado por Waxman *et al.* (2001) en cabras no lactantes (MRT de $4,62 \pm 1,09$ h) y superior al reportado por Fernández-Palacios (2013) en cabras en lactación (MRT = $2,94 \pm 0,44$ h). Esta diferencia podría explicarse por la dosis utilizada en ambos estudios (5 mg/kg vs 2 mg/kg) ya que el MRT depende del AUC, y éste último de la dosis y del Cl (que es mayor, por el efecto de la lactación).

Comparando los parámetros de eliminación de la MFX con los de otras fluoroquinolonas en cabras lactantes (tabla 57), se puede apreciar que el Cl de la MFX en nuestro estudio ($0,27 \pm 0,09$ L/kg/h) fue aproximadamente un 50 % más bajo que el referenciado para gatifloxacina, mientras que la $t_{1/2\lambda e}$ ($3,82 \pm 0,99$ h) y el MRT ($4,14 \pm 1,15$ h) fueron un 15 % y un 40 % menores. Esto podría ser explicado por un mayor V_d de gatifloxacina en relación a MFX ($3,92 \pm 0,69$ y $1,42 \pm 0,45$ L/kg, respectivamente). Comparando con el resto de las quinolonas se observa que, excepto para levofloxacina el Cl de MFX es el menor, y consecuentemente el MRT es el mayor. Es de destacar que el Cl de pefloxacina, es aproximadamente 13 veces mayor que el de MFX, y se corresponde con un V_{ss} muy superior. Los resultados sugieren una mayor permanencia de la MFX en el organismo de las cabras en lactación, en comparación con otras quinolonas objeto de estudio.

La $t_{1/2\lambda e}$ es considerada un parámetro híbrido, ya que se encuentra influenciada por otros parámetros farmacocinéticos independientes con repercusiones fisiológicas directas como son el Cl y el V_d . A su vez, cada uno de estos parámetros se encuentra determinado por otros factores, lo que hace a la $t_{1/2\lambda e}$ un parámetro determinado por múltiples parámetros y constantes farmacocinéticas.

Ecuación 7:

$$t_{1/2\lambda e} = \frac{0,632 Vd}{Cl}$$

Tabla 57: Valores para aclaramiento plasmático (Cl), semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda e}$) y tiempo medio de residencia (MRT) para diferentes fluoroquinolonas en cabras lactantes tras una administración intravenosa.

Antimicrobiano	Cl (L/kg/h)	$t_{1/2\lambda e}$ (h)	MRT (h)
Gatifloxacin ^f	0,61 ± 0,15	4,54 ± 0,75	6,84 ± 1,23
Ibafloxacin ^c	1,05 ± 0,10	3,76*	1,50 ± 0,22
Levofloxacin ^e	0,18 ± 0,04	2,95 ± 0,27	3,74 ± 1,21
Pefloxacin ^a	3,60 ± 0,30	1,60 ± 0,30	1,07 ± 0,13
Moxifloxacin ^b	0,43 ± 0,02	1,94 ± 0,41	1,81 ± 0,15
Orbifloxacin ^d	0,40 ± 0,11	4,12 ± 0,32	2,75 ± 0,41

Abd-El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Fernández Varón *et al.* (^b), 2006; Marín *et al.*, 2007a (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e); Singh *et al.*, 2010 (^f). *: no se reportó desviación estándar.

Por una parte, el Cl total se encuentra directamente influenciado por el Cl_{renal} y el Cl_{hepático}, ya que son los principales órganos de eliminación del compartimiento central. Por otra parte, el V_d se encuentra determinado por el volumen plasmático, el volumen tisular, y las f_{lp} y f_{lt} . Los cambios en alguno o varios de estos factores pueden modificar la $t_{1/2\lambda e}$ (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004d). Esta relación se puede resumir en la ecuación 7, cuanto mayor sea la distribución de una molécula en el organismo, menor cantidad de ella quedará disponible en el compartimiento central (la sangre), desde donde será eliminada, por lo que la semivida de eliminación será más prolongada. Por otra parte, cuanto mayor sea el Cl, más rápido se elimina un fármaco del compartimiento central, por lo que la semivida será más corta. De esta manera, a partir de esta relación podemos analizar los datos observados en los parámetros de eliminación de las fluoroquinolonas estudiadas en cabras lactantes. Así, si bien el Cl de gatifloxacin es mayor al observado para MFX, la $t_{1/2\lambda e}$ es mayor probablemente porque su V_d es muy superior proporcionalmente a la diferencia de los Cl entre ambos ATMs. Lo mismo ocurre con pefloxacin, que si bien su Cl es aproximadamente 13 veces mayor que el de MFX, las diferencias en la $t_{1/2\lambda e}$ no son tan marcadas debido a su gran V_{ss}.

Por otra parte, el MRT es el parámetro que mejor representa la permanencia de un fármaco en el organismo, a diferencia de la $t_{1/2\lambda_e}$, que representa la tasa de eliminación total durante la fase terminal (Toutain Toutain y Bousquet-Mélou, 2004d). El MRT se define en la ecuación 8:

Ecuación 8:

$$MRT = \frac{AUC}{AUMC}$$

De la ecuación 8 puede deducirse que el MRT si bien se ve influenciado de la misma manera por otros parámetros farmacocinéticos como el V_d o V_{ss} , se encuentra en relación directa con el AUC, que depende directamente de la dosis y del Cl. De esta manera, las diferencias entre el MRT y la $t_{1/2\lambda_e}$, se deben principalmente a su forma de cálculo. La $t_{1/2\lambda_e}$ se ve muy influenciada por la pendiente de la fase terminal (λ_e), mientras que el MRT depende principalmente del AUC.

Con respecto a otras especies animales (tabla 12), MFX presentó un valor de $t_{1/2\lambda_e}$ superior a lo informado por Shem-Tov *et al.* en 1997 para vacas y ovejas ($2,07 \pm 0,66$ y $2,18$ horas, respectivamente), indicando una mayor permanencia en el organismo de la MFX en cabras lactantes. Además en la tabla 12, se puede apreciar que la MFX en rumiantes posee valores de Cl superiores a los de las especies no rumiantes, (exceptuando el trabajo de Bousquet-Melou *et al.*, 2002, en equinos); la $t_{1/2\lambda_e}$ observada en nuestro estudio fue similar o inferior a la reportada en equinos por diferentes autores ($7,56 \pm 1,99$ y $4,74 \pm 0,81$ h; Bousquet-Melou *et al.*, 2002; Carretero *et al.*, 2002) y menor que la informada en caninos (12,40 h; Schneider *et al.*, 1996), felinos ($7,98 \pm 0,57$ h; Albarellos *et al.*, 2005) y cerdos ($7,94 \pm 1,21$ h; Ding *et al.*, 2010).

En general, se aprecia que los parámetros mencionados indican una mayor velocidad de eliminación en especies rumiantes respecto a las no rumiantes y que estarían relacionados con los mecanismos fisiológicos de excreción, debido a que sólo se metaboliza un 5 % de la droga. La excreción es realizada en un 66 % a nivel renal (mediante filtración y secreción tubular activa), un 33 % por vías biliares, y en forma despreciable a través de la mucosa intestinal (Martínez *et al.*, 2006). El fenómeno de reabsorción tubular renal, es favorecido en aquellos casos donde la fracción no ionizada del fármaco predomine; esto se encuentra en función del pKa de la molécula y el pH de la orina.

En el caso de la MFX, al poseer un punto isoeléctrico de 6,85 se verá favorecida la reabsorción en condiciones de orinas ácidas, tal como es el caso de los perros y gatos, mientras que en el caso de las cabras cuya orina en condiciones de dieta habitual (pasto) es alcalina (7,20 a 8,00; Smith y Sherman, 2009) la reabsorción es menor, generando consecuentemente un mayor CI respecto a los carnívoros.

5.4.1.2. MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAMUSCULAR

La administración por la vía intramuscular de MFX (5 mg/kg) en las cabras, mostró un perfil farmacocinético similar al informado por Waxman *et al.* (2001), en cabras adultas no lactantes y al reportado por Fernández-Palacios (2013) en cabras en lactación. La absorción resultó ser rápida, tras la administración IM de MFX, y se refleja en los valores de $t_{1/2\lambda a}$, T_{max} y MAT ($0,19 \pm 0,03$ h, $0,75 \pm 0,16$ h y $0,59 \pm 0,58$ h, respectivamente), coincidiendo con Waxman *et al.* (2001) que reporta una T_{max} de $0,90 \pm 0,38$ h. Con respecto a los resultados de Fernández-Palacios (2013) tras administración subcutánea (SC) en cabras lactantes, se reportaron valores de $t_{1/2\lambda a}$ 0,49 h (media armónica), T_{max} $1,08 \pm 0,20$ h y MAT $1,21 \pm 0,75$ h. Como era de esperar, MFX mostró una absorción más rápida tras la vía IM que SC. Los valores de $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} fueron de $20,31 \pm 6,77$ y $20,59 \pm 6,73$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$. Si consideramos que la diferencia de dosis, los valores son similares a los reportados por Waxman *et al.* (2001) de $8,67 \pm 2,08$ y $8,87 \pm 2,12$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, y por Fernández-Palacios (2013) tras la administración SC, con $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} de $8,06 \pm 2,63$ y $8,21 \pm 2,69$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente. La misma relación se aprecia en los valores de C_{max} de $4,19 \pm 0,81$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a $1,87 \pm 0,29$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ descrito por Waxman *et al.* (2001) y $2,11 \pm 0,62$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ reportado por Fernández-Palacios (2013). Los parámetros cinéticos son similares entre los tres estudios, si se tiene en cuenta que en nuestro estudio administramos una dosis 2,5 veces superior (5 mg/Kg PV *versus* 2 mg/Kg PV). La biodisponibilidad tras administración IM fue de $103 \pm 11\%$, similar a la referida por Waxman *et al.* (2001) en cabras adultas no lactantes ($100,74 \pm 20,38$ %) y por Fernández-Palacios (2013) en cabras lactantes tras la administración SC ($108,08 \pm 27,67\%$); y en consonancia con los valores publicados para otras especies (tabla 8).

La estructura química de MFX le confiere ventajas farmacocinéticas.

En relación a otras fluoroquinolonas, estudiadas en cabras lactantes, y contemplando las dosis utilizadas, la MFX presentó un AUC mayor que otras quinolonas (tabla 58). Esto podría deberse a un menor CI, con valores de $t_{1/2\lambda e}$ y MRT más prolongados (tabla 59). El menor CI reportado en este estudio para MFX tanto para la vía IV como IM redundaría en mayores AUC, lo que se traduce en índices de eficacia antimicrobiana más adecuados para el tratamiento de patógenos productores de mastitis en cabras. En general, la biodisponibilidad por vía IM en cabras en lactación resultaron cercanas al 100% para difloxacin y orbifloxacin (Marín *et al.*, 2007b; Marín *et al.*, 2007c); enrofloxacin, levofloxacin y pefloxacin presentaron biodisponibilidades entre el 70% y 85% (Kaartinen *et al.*, 1995; Abd-El-Aty y Goudah, 2002; Goudah y Abo-El-Sooud, 2008). Por otra parte, la MFX mostró una relación entre la C_{max} y la dosis, similar a levofloxacin (aproximadamente 0,80) y superior al resto de las quinolonas estudiadas en cabras lactantes, que mostraron relaciones menores a 0,50. Marbofloxacin presentó una rápida absorción tras la administración IM similar a enrofloxacin, orbifloxacin y pefloxacin, e inferior a levofloxacin, moxifloxacin y difloxacin (tabla 58).

Tabla 58: Valores de AUC_{∞} , C_{max} , T_{max} y MAT en suero de cabra tras administración intramuscular de fluoroquinolonas.

Antimicrobiano	Dosis (mg/kg)	AUC_{∞} ($\mu g \cdot h/ml$)	C_{max} ($\mu g/ml$)	T_{max} (h)	MAT
Levofloxacin ^e	4,00	21,30 \pm 1,20	3,20 \pm 0,50	1,80 \pm 0,30	1,90 \pm 0,70
Moxifloxacin ^b	5,00	10,90 \pm 3,60	2,80 \pm 0,60	1,70 \pm 1,20	-
Difloxacin ^c	5,00	16,70 \pm 1,90	2,00 \pm 0,40	1,80 \pm 1,10	5,30 \pm 2,40
Orbifloxacin ^d	2,50	6,00 \pm 0,60	1,70 \pm 0,20	0,90 \pm 0,40	0,10 \pm 0,10
Pefloxacin ^a	10,00	2,00 \pm 0,10	0,90 \pm 0,10	0,70 \pm 0,00	1,10 \pm 0,20

Todos los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. Abd El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Cárceles *et al.*, 2007 (^b); Marín *et al.*, 2007c (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e).

La C_{max} y el T_{max} son parámetros que se relacionan con la velocidad y cantidad de fármaco absorbido a la sangre. La relación entre la C_{max} y la dosis también es un indicador de los procesos de absorción de un fármaco, y puede ser influido por factores tales como la formulación del medicamento, el flujo sanguíneo en el sitio de administración y las características físico-químicas de la molécula (principalmente su liposolubilidad y su grado de ionización) tal como se describe en el apartado de

farmacocinética de ATM, de la revisión bibliográfica. De esta manera, el C_{max} , T_{max} y la relación $C_{max}/dosis$, así como los valores de biodisponibilidad, indican que la MFX presenta una rápida y completa absorción tras su administración por vía IM.

El MAT se define como la diferencia entre el MRT de la vía extravascular y el MRT de la vía intravenosa. MFX, al igual que otras quinolonas (salvo difloxacin) presentaron T_{max} y MAT similares tras la administración IM. Nos gustaría destacar que el MAT informado para difloxacin, tras administración de 5 mg/kg vía IM, es muy superior al T_{max} . El autor propone que, dado que el MAT de la vía IM fue superior al MRT de la vía IV, podría existir un fenómeno de “flip-flop” que explique estos resultados (Marín *et al.*, 2007a).

Con respecto a otras especies de rumiantes, la MFX mostró una biodisponibilidad similar en vacas lactantes (107,60%), y mayor que la reportada en ovejas lactantes (86,00%). La C_{max} en ovejas y vacas lactantes y no lactantes fue similar a la reportada por Waxman *et al.* (2001) pero inferior a la obtenida nuestro estudio, debido a la dosis empleada (2,50 y 2,00 mg/kg respectivamente *versus* 5mg/kg). El T_{max} observado en este estudio fue similar al reportado para ovejas y vacas lactantes y no lactantes, dado que este parámetro no se ve tan influenciado por la dosis utilizada como la C_{max} .

Con respecto a los parámetros de eliminación de MFX, tras la administración IM en cabras lactantes, obtuvimos valores de $t_{1/2\lambda e}$ de $4,25 \pm 0,93$ h y MRT de $4,72 \pm 1,17$ h, ambos similares a los valores observados en nuestro estudio tras administración IV. Los valores de MRT están en consonancia con los de Waxman *et al.* (2001), en cabras no lactantes ($t_{1/2\lambda e}$ $6,77 \pm 0,52$ h y MRT $4,62 \pm 1,09$ h) y los de Fernández-Palacios (2013) en cabras lactantes, vía SC, $t_{1/2\lambda e}$ de 6,77 (media armónica) y $4,15 \pm 0,55$ h, respectivamente. Las diferencias en $t_{1/2\lambda e}$ entre nuestro estudio y las observadas tras administración vía SC en cabras lactantes, podría deberse a un mayor V_d , dado que ambos MRT son similares.

Los valores de los parámetros de eliminación del presente estudio son similares a los publicados en otras especies de rumiantes como bovinos y ovinos lactantes (Shem-Tov *et al.*, 1997; Aliabadi y Lees., 2002; Ismail y El-Kattan., 2007; Sidhu *et al.*, 2010a; Sidhu *et al.*, 2011; Belew *et al.*, 2015).

Tabla 59: Valores de $t_{1/2\lambda e}$ (o $t_{1/2\beta}$) y MRT en suero de cabras lactantes tras la administración intramuscular de diferentes fluoroquinolonas.

Antimicrobiano	Dosis (mg/kg)	$t_{1/2\lambda e-\beta}$ (h)	MRT (h)
Levofloxacin ^e	4,00	3,64 ± 0,42	5,24 ± 1,12
Moxifloxacin ^b	5,00	1,31 ± 0,64	3,27 ± 0,85
Difloxacin ^c	5,00	10,44*	8,92 ± 1,90
Orbifloxacin ^d	2,50	3,34 ± 0,05	2,82 ± 0,37
Pefloxacin ^a	10,00	2,52 ± 0,19	2,14 ± 0,19

Todos los resultados se expresan como media ± desvío estándar. *: no se reportó el desvío estándar. Abd El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Cárceles *et al.*, 2007 (^b); Marín *et al.*, 2007c (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e).

La MFX mostró en general una eliminación más lenta que el resto de las quinolonas estudiadas en cabras lactantes (tabla 59), aunque similar a levofloxacin, con valores de $t_{1/2\lambda e}$ y MRT similares. La difloxacin presentó una eliminación más lenta que la MFX y que el resto de las quinolonas en cabras lactantes. Como hemos mencionado, posiblemente debido a un fenómeno de “flip-flop” (Marín *et al.*, 2007a). Por otra parte, puede observarse que el MRT de la MFX como del resto de las fluoroquinolonas estudiadas, es superior que el correspondiente a la vía IV, dado que el MRT tras una administración extravascular aúna los tiempos medios de absorción y eliminación.

Considerando los parámetros farmacocinéticos de MFX evaluados, tras administración de una dosis de 5 mg/kg por las vías IV e IM, en cabras en lactación; podríamos resumir que presenta una rápida y completa absorción por vía IM, una muy buena distribución tisular y permanencia relativamente prolongada en el organismo.

5.4.2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE

5.4.2.1. MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAVENOSA

Tras la administración IV, en forma de bolo, MFX mostró una C_{max} en leche de $3,03 \pm 0,67$ µg/ml con una T_{max} de 2 h, en todos los animales (tabla 31, tabla 83). Tras la administración IV de 2 mg/kg en cabras lactantes, MFX presentó una C_{max} de $1,25 \pm 0,88$ µg/ml y un T_{max} de $2,17 \pm 0,98$ h (Fernández-Palacios, 2013). El cociente entre las C_{max} de la vía IM y la SC se aproxima a 2,40, mientras que los cocientes entre cada C_{max} y la dosis administrada fueron de 0,61 y 0,62 para las vías IM y SC, respectivamente, lo cual demuestra que las diferencias entre las C_{max} obtenidas fueron debidas a la dosis

ensayada en cada estudio. Nuestro valor de T_{max} es similar al observado por Fernández Varón *et al.* (2006) con moxifloxacina en cabras tras la administración IV, pero superior a los de levofloxacina, gatifloxacina y orbifloxacina informados por Goudah y Abo-El-Sooud (2008), Singh *et al.* (2010) y Marín, *et al.* (2007b), respectivamente (tabla 60). La diferencia entre el valor de T_{max} para MFX respecto al resto de quinolonas (a excepción de moxifloxacina), puede ser debida a que realizamos la primera toma de muestra a las 2h post-administración, mientras que el resto de los estudios fue tomada en un tiempo anterior. La relación entre el promedio de la C_{max} y la dosis para MFX fue de 0,61 en nuestro estudio, mientras que para levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina y orbifloxacina fueron de 0,91, 0,73, 0,92 y 0,62, respectivamente. Estos valores indican una buena distribución de este grupo de antimicrobianos desde la sangre hacia la leche, que se correlaciona con los valores altos de V_d y V_{ss} informados en suero. La relación entre la C_{max} en leche y la dosis utilizada, y el T_{max} , se asocian con la cantidad y velocidad a la cual el fármaco pasa de la sangre a la leche. No obstante, la producción láctea puede influir en la C_{max} en leche, debido principalmente a un fenómeno de dilución (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007).

Tabla 60: Valores de C_{max} y T_{max} en leche de cabra tras administración intravenosa.

Droga	Dosis (mg/kg)	C_{max} (µg/ml)	T_{max} (h)
Levofloxacina ^c	4,0	3,65 ± 0,39	0,45 ± 0,13
Moxifloxacina ^a	5,0	3,66 ± 0,25	2,00 ± 0,00
Gatifloxacina ^d	10,0	9,17 ± 1,41	0,67 ± 0,32
Orbifloxacina ^b	2,5	1,56 ± 0,18	1,83 ± 0,37

Todos los resultados se expresan como media ± desvío estándar. Fernández Varón *et al.*, 2006 (^a); Marín *et al.*, 2007b (^b); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^c); Singh *et al.*, 2010 (^d).

Para evaluar el grado de difusión de la MFX desde la sangre a la leche de cabra, se utilizó la relación $AUC_{(0-t)}$ leche/suero, que resultó en un valor cercano a la unidad (0,93 ± 0,08), reflejando una excelente biodisponibilidad en leche de cabra tras la administración IV de 5 mg/kg. De manera similar, la relación $AUC_{(0-t)}$ leche/suero obtenida tras la administración IV de MFX a una dosis de 2 mg/kg en cabras lactantes fue de 0,86 ± 0,47, lo que indica una buena difusión de la MFX a leche (Fernández-Palacios, 2013). En la tabla 46, se puede observar que la levofloxacina y orbifloxacina presentaron relaciones similares, mientras que la ibafloxacina presentó una relación

$AUC_{(0-t)}$ leche/suero muy baja, indicando una pobre penetración a la glándula mamaria. Por el contrario, gatifloxacina, moxifloxacina y pefloxacina presentaron las mejores relaciones $AUC_{(0-t)}$ leche/suero (entre 2 y 3). Los autores señalan que este hecho podría explicarse por un fenómeno de acumulación del fármaco en glándula mamaria, debido principalmente a fenómenos de trampa iónica (atrapamiento en función del pH) y unión a los componentes grasos y proteicos de la leche de cabra.

Tabla 61: Valores de la relación AUC leche/suero y V_{ss} para diferentes fluoroquinolonas en cabras lactantes tras una administración intravenosa.

Antimicrobiano	AUC leche/suero	V_{ss} (L/kg)
Gatifloxacina ^f	2,34	$3,92 \pm 0,69^*$
Ibafloxacina ^c	0,20	$1,65 \pm 0,42$
Levofloxacina ^e	0,81	$0,73 \pm 0,22$
Pefloxacina ^a	3,33	$5,14 \pm 0,21$
Moxifloxacina ^b	1,86	$0,79 \pm 0,08$
Orbifloxacina ^d	1,02	$1,13 \pm 0,08$

*: Corresponde al V_d . Abd-El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Fernández Varón *et al.*, 2006 (^b); Marín *et al.*, 2007^a (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e); Singh *et al.*, 2010 (^f).

Las fluoroquinolonas son compuestos ácidos débiles que en un rango de pH entre 6 y 8 se encuentran levemente ionizadas, presentando la mayoría de estos compuestos, un bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (tabla 10) y por lo tanto la fracción libre de fármaco en la sangre es alta. Estas características le permiten a las fluoroquinolonas atravesar fácilmente las membranas biológicas y llegar fácilmente a la leche desde la sangre mediante un proceso de difusión pasiva. Los resultados observados de las relaciones $AUC_{(0-t)}$ leche/suero, se corresponden con los valores de V_d y V_{ss} de dichas moléculas (según se comentó en el apartado correspondiente de la revisión bibliográfica), lo cual pone de manifiesto la gran capacidad de distribución que posee este grupo de ATMs.

En el caso de ibafloxacina, como puede apreciarse en la tabla 46, la relación $AUC_{(0-t)}$ leche/suero es de 0,20 y presenta un valor de V_{ss} de 1,65 L/kg (superior a MFX). Este resultado contrasta con los de otros estudios realizados con fluoroquinolonas en leche de cabra, donde el valor de la relación $AUC_{(0-t)}$ leche/suero fue proporcional al V_{ss} (Marín *et al.*, 2007a). Los autores no explican las posibles causas de estas observaciones.

Tras administración IV de MFX, en forma de bolo, obtuvimos valores de $t_{1/2\lambda e}$ en leche $5,86 \pm 0,37$ h y MRT de $6,36 \pm 1,29$ h (tabla 31), superiores a los obtenidos por Fernández-Palacios (2013) en cabras lactantes (MRT de $5,05 \pm 0,54$ h). Lo cual puede ser causado por la diferencia de dosis utilizada en cada estudio. Estas observaciones reflejan una mayor permanencia de MFX en leche de cabras, en comparación con otras fluoroquinolonas (tabla 62). Al analizar estos datos, junto a los obtenidos para Cl, $t_{1/2\lambda e}$ y MRT séricos, observamos que la MFX presenta valores menores de Cl, y valores de $t_{1/2\lambda e}$ y MRT séricos y lácteos superiores al resto de las quinolonas anteriormente mencionadas. Esto indica que los mecanismos de eliminación centrales presentan una influencia determinante en el comportamiento farmacocinético de MFX en leche de cabras.

En la comparación de parámetros cinéticos destacamos que mientras que la relación $t_{1/2\lambda e}$ leche/suero para MFX, fue de $1,62 \pm 0,40$, la relación MRT leche/suero observada para MFX, fue de $1,58 \pm 0,29$ (tabla 33). Ambas relaciones muestran que la MFX en leche de cabra, tras su administración IV (5 mg/kg), presenta una mayor permanencia en leche con respecto al suero de cabras lactantes. De esta manera, al analizar en conjunto los datos, existe evidencia que MFX presentaría un fenómeno de atrapamiento en leche de cabra, lo cual podría ser explicado por un fenómeno de partición por pH o bien por acumulación en la fracción grasa o proteica de la leche de cabra (Begg *et al.*, 1992).

Tabla 62: Valores para la $t_{1/2\lambda e}$ (o $t_{1/2\beta}$) láctea, plasmática y la relación de ambas para diferentes fluoroquinolonas en cabras lactantes tras una administración intravenosa.

Droga	$t_{1/2\lambda e}$ leche (h)	$t_{1/2\lambda e}$ suero (h)	$t_{1/2\lambda e}$ leche/suero
Gatifloxacin ^f	$3,67 \pm 0,22$	$4,54 \pm 0,75$	0,81
Ibafloxacin ^{c*}	2,37	3,76	0,63
Levofloxacin ^e	$3,67 \pm 0,84$	$2,95 \pm 0,27$	1,24
Pefloxacin ^a	$2,75 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,30$	1,72
Moxifloxacin ^b	$2,17 \pm 0,18$	$1,94 \pm 0,41$	1,12
Orbifloxacin ^d	$1,84 \pm 0,16$	$4,12 \pm 0,32$	0,45

Los resultados de se expresan como media \pm desvío estándar. *: no se informó el desvío estándar. Abd-El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Fernández Varón *et al.*, 2006 (^b); Marín *et al.*, 2007a (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e); Singh *et al.*, 2010 (^f).

La mayor persistencia observada en leche para marbofloxacin, levofloxacin, pefloxacin y moxifloxacin (relaciones $t_{1/2\lambda_e}$ leche/suero > 1), podría indicar que al igual que sucede con las relaciones $AUC_{(0-t)}$ leche/suero, en la leche ocurre un fenómeno de trampa iónica debido a las diferencias entre el pH sanguíneo y el pH lácteo (aproximadamente 7,40 y 6,50, respectivamente). Dado que MFX presenta valores de pK_a de 5,69 y 8,00, con un punto isoeléctrico de 6,85, los cálculos de partición por pH basados en las fórmulas desarrolladas en la revisión bibliográfica indican que en la leche, la fracción ionizada de MFX será de 30,88%, mientras que en el plasma la fracción ionizada será del 21,99%. De esta manera, esta diferencia de aproximadamente un 10% en la fracción ionizada entre la leche y el plasma, podría explicar al menos en parte los resultados observados, aunque es poco probable que sea el único factor determinante. Por otro lado, se ha demostrado que muchos fármacos se depositan en la fracción grasa o proteica de la leche, lo cual junto con el fenómeno de partición por pH, podría ser relevante en la acumulación de MFX en leche de cabras (Begg *et al.*, 1992). El mecanismo de este fenómeno se desarrolló en detalle en el apartado de farmacocinética de la revisión bibliográfica. Sin embargo, en el caso de levofloxacin y orbifloxacin, que poseen valores no muy alejados de la unidad, estas diferencias podrían no ser significativas. Los datos estadísticos no se encuentran disponibles en los respectivos estudios, por lo que no pueden extraerse conclusiones definitivas (Abd-El-Aty y Goudah, 2002; Fernández Varón *et al.*, 2006; Goudah y Abo-El-Sooud, 2008).

A su vez, orbifloxacin, ibafloxacin y gatifloxacin presentaron $t_{1/2\lambda_e}$ lácteas menores que las séricas (hecho que se ve reflejado con relaciones $t_{1/2\lambda_e}$ leche/suero < 1), lo que indicaría que el fenómeno de atrapamiento iónico no se da para estas moléculas en leche de cabra.

En resumen, MFX, tras administración IV, de 5 mg/kg en forma de bolo, mostró una rápida y amplia difusión hacia leche. La biodisponibilidad láctea fue cercana al 100%. Existe evidencia de que MFX tiene mayor permanencia en leche que en suero, lo que podría indicar la presencia de fenómenos de atrapamiento iónico o fijación a la grasa, proteínas o la fracción globular de la leche.

5.4.2.2. MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAMUSCULAR

La administración intramuscular de 5 mg/kg de MFX presentó C_{\max} $3,36 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$ en leche, en T_{\max} $2,33 \pm 0,82 \text{ h}$ (tabla 31). Inferior a la observada por Fernández-Palacios (2013), post-administración SC de 2 mg/kg en cabras lactantes (C_{\max} de $1,69 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$). El cociente entre las C_{\max} de la vía IM y la SC es aproximadamente dos (1,99), mientras que los cocientes entre cada C_{\max} y la dosis administrada fueron de 0,67 y 0,84, para las vías IM y SC, respectivamente, lo cual demuestra que las diferencias entre las C_{\max} obtenidas fueron debidas principalmente a la dosis ensayada, mostrando un pasaje a leche similar por ambas vías. Si comparamos con otras quinolonas estudiadas en cabras lactantes, la relación entre la C_{\max} obtenida y la dosis fue: 0,67, 0,81, 0,79, 0,26 y 0,71, para MFX (presente estudio) y levofloxacin, moxifloxacin, difloxacin y orbifloxacin, respectivamente. A excepción de difloxacin, las relaciones fueron similares (tabla 63). En relación al tiempo necesario para alcanzar la C_{\max} , MFX presentó un T_{\max} similar a difloxacin y orbifloxacin, superior a levofloxacin e inferior a moxifloxacin. Con respecto a su difusión a leche, si comparamos los valores de T_{\max} en leche post-administración IM *versus* IV, se observa que tanto en el caso de MFX como en otras quinolonas estudiadas, el T_{\max} post-administración IM es mayor; debido a los procesos de liberación y absorción del fármaco desde el punto de administración. El paso a la leche se ve enlentecido; también se refleja sobre el MRT entre las vías IM e IV.

Tabla 63: Valores de C_{\max} y T_{\max} en leche de cabra tras administración intramuscular.

Antimicrobiano	Dosis (mg/kg)	C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{\max} (h)
Levofloxacin ^d	4,0	3.26 ± 0.34	0.75 ± 0.21
Moxifloxacin ^a	5,0	3.94 ± 1.90	3.67 ± 0.81
Difloxacin ^b	5,0	1.28 ± 0.19	2.67 ± 1.03
Orbifloxacin ^c	2,5	1.77 ± 0.23	2.00 ± 0.00

Todos los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. Cárceles *et al.*, 2007 (^a); Marín *et al.*, 2007c (^b); Marín *et al.*, 2007b (^c); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^d).

Se analizó la relación $\text{AUC}_{(0-t)}$ leche/suero, para evaluar el grado de difusión de MFX desde la sangre a la leche, post-administración IM, obteniendo valores cercanos a la unidad ($0,89 \pm 0,19$), que reflejan una excelente biodisponibilidad de MFX en leche de cabra. Similares ($\text{AUC}_{(0-t)}$ leche/suero $0,97 \pm 0,33$) a los presentados por Fernández-Palacios (2013) tras la administración SC de MFX, 2 mg/kg, en cabras lactantes. Lo que

indica una buena difusión de la MFX a leche. Si bien la relación $AUC_{(0-t)}$ leche/suero observada en nuestro estudio es aparentemente menor que la reportada en cabras lactantes tras una administración SC, es importante recordar que las AUC de leche y suero no mostraron diferencias significativas en este estudio. Estos resultados se corresponden con los altos valores de V_d ($1,42 \pm 0,45$ L/kg) y V_{ss} ($1,05 \pm 0,24$ L/kg) de nuestro estudio. Lo cuál pone de manifiesto la gran capacidad de difusión a diferentes tejidos y secreciones orgánicas que posee MFX. Al contrastar nuestros datos con los observados en las fluoroquinolonas anteriormente expuestas (tabla 64), puede apreciarse como levofloxacin y orbifloxacin presentaron relaciones similares, mientras que difloxacin presentó una relación AUC_{∞} leche/suero muy baja, indicando una pobre biodisponibilidad en glándula mamaria. Por el contrario, moxifloxacin y pefloxacin presentaron las mejores relaciones AUC_{∞} leche/suero. Los autores señalan que este hecho podría explicarse por un fenómeno de acumulación del fármaco en glándula mamaria, debido principalmente a fenómenos de trampa iónica y unión a los componentes grasos y proteicos de la leche de cabra. En el caso de pefloxacin, la relación AUC leche/suero de $3,36 \pm 0,41$ se correlaciona con un elevado V_{ss} ; lo que refleja una importante acumulación de pefloxacin en leche de cabra.

Tabla 64: Valores de relación AUC leche/suero y V_{ss} para diferentes fluoroquinolonas en cabras lactantes tras una administración intramuscular.

Droga	AUC leche/suero	V_{ss} (L/kg)
Levofloxacin ^e	1,01 ± 0,18	0,73 ± 0,22
Pefloxacin ^a	3,36 ± 0,41	5,14 ± 0,21
Moxifloxacin ^b	1,80 ± 0,49	0,79 ± 0,08
Difloxacin ^c	0,65 ± 0,09	1,16 ± 0,26
Orbifloxacin ^d	1,21 ± 0,19	1,13 ± 0,08

Todos los resultados se expresan como media ± desvío estándar. Abd El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Cárceles *et al.*, 2007 (^b); Marín *et al.*, 2007c (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e).

La $t_{1/2\lambda e}$ en leche para MFX en el presente estudio fue de $4,59 \pm 1,05$ h y el MRT de $5,44 \pm 0,59$ h (tabla 31); similares a los obtenidos por Fernández-Palacios (2013), que reportó un MRT de $5,16 \pm 0,28$ h, tras la administración de 2 mg/kg de MFX en cabras lactantes. Al analizar los parámetros de eliminación en suero ($t_{1/2\lambda e}$ y MRT), observamos que la MFX presenta valores de $t_{1/2\lambda e}$ sérica y láctea superiores a la mayoría de las quinolonas analizadas en esta discusión, salvo pefloxacin y difloxacin, que mostraron mayor permanencia en leche que MFX (tabla 65). Por otra parte, la $t_{1/2\lambda e}$ en leche resultó significativamente inferior a la observada tras la administración IV, aunque el MRT no presentó diferencias entre ambas vías. Este fenómeno podría deberse a diferencias en la pendiente de eliminación de la fase terminal, o en diferencias de origen estadístico.

Tabla 65: Valores de $t_{1/2\lambda e}$ o $t_{1/2\beta}$ y MRT en leche de cabras lactantes tras la administración intramuscular.

Droga	$t_{1/2\lambda e-\beta}$ leche (h)	$t_{1/2\lambda e-\beta}$ suero (h)	$t_{1/2\lambda e-\beta}$ leche/suero
Levofloxacin ^e	3,84 ± 0,76	3,64 ± 0,42	1,05
Moxifloxacin ^b	3,82 ± 1,09	1,31 ± 0,64	2,92
Difloxacin ^c	6,38*	10,44*	0,61
Orbifloxacin ^d	1,94 ± 0,36	3,34 ± 0,05	0,58
Pefloxacin ^a	5,92 ± 0,47	2,52 ± 0,19	2,35

Todos los resultados se expresan como media ± desvío estándar. *: no se reportó el desvío estándar. Abd El-Aty y Goudah, 2002 (^a); Cárceles *et al.*, 2007 (^b); Marín *et al.*, 2007c (^c); Marín *et al.*, 2007b (^d); Goudah y Abo-El-Sooud, 2008 (^e).

Al enfrentar los parámetros de MFX en leche/suero, observamos que la relación para $t_{1/2\lambda e}$ leche/suero, fue de $1,16 \pm 0,48$, mientras que la relación MRT leche/suero fue de $1,22 \pm 0,34$ (tabla 33, pag. 113).

A diferencia de la vía IV, no se detectaron diferencias significativas entre los parámetros de eliminación en leche y suero tras la administración IM de MFX. Esto podría ser debido a que, tras su administración IM, los procesos de absorción incrementaron los valores de estos parámetros en suero y los redujeron en leche; si bien no se detectaron diferencias significativas entre ellos en ambas vías de administración. Resultados similares se describieron para levofloxacin. En el caso de difloxacin y orbifloxacin, la eliminación en leche fue más rápida que en sangre. Lo opuesto ocurrió con pefloxacin y moxifloxacin, con relaciones de 2,35 y 2,92, respectivamente.

Tras administración IM, MFX presentó una rápida y amplia biodisponibilidad en leche de cabra. Si bien en la vía IV se evidenció una mayor permanencia de MFX en leche con respecto al suero, esto no ocurrió con la vía IM. Aunque las relaciones leche/suero de los parámetros de eliminación son superiores a la unidad, las diferencias no son tan amplias; por lo que probablemente el número de animales implicados en el presente estudio no sean suficientes para detectar diferencias significativas. No se encontraron diferencias al analizar los índices lácteos entre las vías IV e IM (tabla 33), por lo que es posible que al incrementar la cantidad de animales estas diferencias pudieran ser detectadas.

La excelente biodisponibilidad de la MFX en leche de cabras, tras la administración IM de 5 mg/kg, hace de esta vía una opción potencialmente eficaz para el tratamiento de mastitis caprinas.

5.5. CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE EFICACIA Y SIMULACIÓN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA INTRAMUSCULAR

Con respecto a los

En la tabla 34 se muestran los valores de los índices PK/PD calculados a partir de integrar los parámetros farmacocinéticos (tras la administración una dosis de 5 mg/kg de MFX, vía IM, en cabras lactantes sanas) con los datos de sensibilidad (CIM_{90}) obtenidos para ECN y *S. aureus*. Puede observarse que 2 de los 6 animales mostraron un $C_{max}/CIM_{90} < 10$ y un $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} < 40$. Teniendo en cuenta que establecimos como puntos de corte los valores $C_{max}/CIM_{90} > 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 60$ (Lister, 2002; McKellar *et al.*, 2004; McKellar y Boggio, 2007); consideramos que la dosis de MFX ensayada no cumplió con los criterios de eficacia óptima deseados. Por lo que se procedió a realizar

una simulación de dosis múltiple para predecir un esquema terapéutico que mostrara eficacia clínica y eficacia bactericida. La dosis de MFX administrada por vía IM, en cabras lactantes, calculada como óptima fue 10 mg/kg/día para un régimen multidosis.

Los índices MPC_{90}/CIM_{90} se encuentran relacionados con el desarrollo y selección de poblaciones resistentes que poco a poco comienzan a separarse de la población original sensible al ATM (Canut Blasco *et al.*, 2015). Con respecto a las MPC obtenidas de cepas de estafilococos, los índices MPC_{90}/CIM_{90} fueron de 2,00 para *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas; 2,00 la cepa control ATCC 29213; 7,00 la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 6,60 para *Staphylococcus intermedius*, respectivamente. De esta manera, puede observarse que tanto los *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas, como la cepa control ATCC 29213 presentaron menor riesgo de selección de mutantes resistentes, ya que su MSW es baja. Mientras que, las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus pseudointermedius* mostraron índices altos (y por lo tanto una MSW también mayor), lo que indica que el riesgo de que el ATM se encuentre dentro de la MSW por mucho tiempo es alto.

Con respecto a los puntos de corte de los indicadores de prevención de selección de mutantes (C_{max}/MPC_{90} , $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ y T_{MSW}), no están tan bien establecidos para fluoroquinolonas como lo están los indicadores de eficacia. Varios autores proponen que el T_{MSW} no debería superar el 20% del intervalo de dosificación y que valores de C_{max}/MPC_{90} de fármaco libre comprendidos entre 0,32 - 2,20 y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ entre 4-25 están relacionados con la ausencia de cepas mutantes resistentes (Liang *et al.*, 2011; Körber-Irrgang *et al.*, 2012).

En ausencia de datos propios, hemos partido de datos publicados, para ensayar un cálculo de indicadores de prevención de selección de mutantes (únicamente son específicas las cepas de *S. aureus*; datos tomados de Fernández-Palacios, 2013):

- Cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ($MPC_{90} = 3,50 \mu\text{g/ml}$), los valores de C_{max}/MPC_{90} entre 0,80 y 1,45 ($1,20 \pm 0,23$), los valores de $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ entre 4,02 y 9,24 ($5,80 \pm 1,93$) y el T_{MSW} osciló entre el 23% y el 58% ($37 \pm 14\%$).
- Cepas *Staphylococcus pseudointermedius* ($MPC_{90} = 3,30 \mu\text{g/ml}$), los valores de C_{max}/MPC_{90} se encontraron entre 0,85 y 1,54 ($1,27 \pm 0,25$) y el $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ osciló entre 4,27 y 9,80 ($6,15 \pm 2,05$), y el T_{MSW} entre 22% y 54% ($35 \pm 12\%$).

- Cepas *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas ($MPC_{90} = 1,00 \mu\text{g/ml}$), la C_{max}/MPC_{90} se encontró entre 2,81 y 5,07 ($4,19 \pm 0,81$), el $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ varió entre 14,08 y 32,35 ($20,31 \pm 6,77$), siendo la T_{MSW} entre 11% y 23% ($14 \pm 5\%$).
- Cepa ATCC 25922 presentó una C_{max}/MPC_{90} entre 5,63 y 10,15 ($8,38 \pm 1,62$), el $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ osciló entre 28,15 y 64,71 ($40,62 \pm 13,54$), y el T_{MSW} estuvo entre 5% y 23% ($11 \pm 6\%$).

A la vista de estos valores, puede resumirse que tras una dosis de 5 mg/kg de MFX por vía IM, los indicadores de prevención de selección de mutantes serían adecuados para las cepas con MPC_{90} más bajas, mientras que se encontrarían al límite de lo óptimo para las cepas con MPC_{90} de 3,30 $\mu\text{g/ml}$ y 3,50 $\mu\text{g/ml}$, principalmente por los valores de T_{MSW} superiores al 20% del intervalo de dosis. Obviamente, las cepas con índices MPC_{90}/CIM_{90} más elevados, muestran T_{MSW} proporcionalmente mayores que los de las cepas con índices más bajos, porque al ser mayor la MSW (mayor diferencia entre MPC_{90} y CIM_{90}) el T_{MSW} también es mayor (Canut Blasco *et al.*, 2015).

Dado que los puntos de corte de estos indicadores PK/PD no están bien definidos todavía, no se pueden extraer conclusiones definitivas.

5.6. MARBOFLOXACINA: RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE EN ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA

5.6.1. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN SUERO

Tras la administración de MFX por vía IM a una dosis de 10 mg/kg/día durante 5 días, en cabras con mastitis subclínica, se observó que los perfiles séricos resultaron típicos de un régimen no acumulativo, tal como se observa en la figura 18.

Las $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} obtenidas ($43,46 \pm 8,32$ y $44,69 \pm 8,70 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$) fueron aproximadamente el doble con respecto a la administración IM en cabras lactantes sanas, a las que se administró 5 mg/kg de MFX y aproximadamente 5 veces mayores a los reportados por Waxman *et al.* (2001) por vía IM en cabras no lactantes y Fernández-Palacios, por vía SC en cabras lactantes, tras la administración de 2 mg/kg de MFX. Las AUC están en correspondencia con la dosis utilizada (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c). Como puede observarse en la tabla 38, las AUC presentaron una tendencia a disminuir a lo largo del tratamiento, y fueron significativamente más elevadas en el primer día de tratamiento que en el tercero y quinto día. Este fenómeno podría estar relacionado a un

incremento significativo en la producción láctea durante el tratamiento, en respuesta a la resolución de la mastitis, como puede observarse en la figura 20. En animales en lactación, la eliminación de ATMs mediante el ordeño adquiere relevancia en el comportamiento farmacocinético de los mismos. Entre los factores que determinan la cantidad de fármaco que será eliminado por leche se destacan la producción láctea y la frecuencia de ordeño (San Andrés y de Lucas Burneo, 2007). Como se discutió anteriormente, las fluoroquinolonas atraviesan la barrera hematoglandular mamaria, mediante difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración, y las concentraciones lácteas se encuentran en equilibrio con las séricas. Sumado a ello, existe evidencia de acumulación de muchas fluoroquinolonas en leche (incluida la MFX), mediante fenómenos de atrapamiento iónico y fijación a estructuras lipídicas o la fracción globular de la leche (Begg *et al.*, 1992; San Andrés y de Lucas Burneo, 2007). Debido a la tendencia de equilibrar las concentraciones entre el suero y la leche, si la producción láctea se ve incrementada es mayor la cantidad de fármaco que difundirá a través de la glándula mamaria a la leche. Al realizar el ordeño, se favorece la eliminación del ATM del organismo, y de esta manera la eliminación del fármaco es más rápida. Por el contrario, si el ordeño no ocurre, la leche es un reservorio para el ATM, por lo que la eliminación será más lenta; dado que a medida que las concentraciones séricas del fármaco disminuyan, el ATM almacenado en la leche volverá hacia la sangre, mediante el mismo proceso de difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración.

De esta manera, los mayores valores de AUC observados en el primer día de tratamiento en comparación con el tercero y quinto día, podría ser explicado por una menor producción láctea debido a la enfermedad, lo que redundaría en un menor pasaje de MFX desde la sangre hacia la leche. De modo que las AUC resultarían mayores que el resto de los días, en los que una mayor cantidad de MFX es almacenada en la leche de cabra (tabla 38). En este estudio se ordeñó a los animales una vez al día, previo a la administración de MFX, para emular las condiciones a las que son sometidos en la explotación comercial. Posteriormente y durante todo el intervalo entre administraciones no se ordeñó a los animales, por lo que la leche en vez de comportarse como una vía de eliminación se comportó como un reservorio de MFX; si se tiene en cuenta que encontramos evidencia de acumulación en leche de cabra.

En comparación con la C_{\max} de $4,19 \pm 0,81 \mu\text{g/ml}$, observada tras la administración IM de MFX (una dosis de 5 mg/kg) las C_{\max} correspondientes a la administración multidosis de 10 mg/kg/día por vía IM resultaron ser aproximadamente el doble, lo que se correlacionaría con valores más adecuados del indicador PK/PD C_{\max}/CIM_{90} (tabla 38). De la misma manera, las C_{\max} alcanzadas tras la administración de 10 mg/kg de MFX por vía IM, fueron aproximadamente 5 veces mayores a las observadas en los trabajos de Waxman *et al.* (2001) por vía IM y Fernández-Palacios (2013) por vía SC. Las relaciones de las C_{\max} con la dosis fueron de 0,84, 0,83, 0,93 y 0,84 en cada caso, evidenciando nuevamente la relación entre la dosis administrada y la C_{\max} observada. Si bien no se detectaron diferencias significativas entre las C_{\max} en el régimen multidosis, el valor de significancia obtenido en el test fue $p = 0,06$. Este valor se encuentra cerca del valor de significancia seleccionado de $p = 0,05$. Por otra parte, se observó una tendencia de la C_{\max} a disminuir a medida que avanzaba el tratamiento, lo que se correspondería con una menor difusión de MFX a leche en el primer día de tratamiento, con respecto al resto de días. Las T_{\max} fueron similares a las de la administración de dosis única, vía IM.

Con respecto a los parámetros de eliminación, la $t_{1/2\lambda_e}$ fue significativamente más baja en el primer día de tratamiento que en el resto de los días (tabla 38). La $t_{1/2\lambda_e}$ es un parámetro híbrido, y su valor depende del volumen de distribución y del aclaramiento plasmático (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004d). Estos últimos parámetros (V_d y Cl) tienen una base fisiológica directa y se los considera parámetros independientes. La relación entre la $t_{1/2\lambda_e}$ con estos parámetros independientes se resumen en la ecuación 7 descrita anteriormente.

Como puede observarse, la $t_{1/2\lambda_e}$ aumenta proporcionalmente al volumen de distribución, y disminuye a medida que el aclaramiento plasmático se incrementa. Este fenómeno presenta una base biológica, ya que si el fármaco se distribuye ampliamente a los tejidos y secreciones del organismo, este abandona el compartimiento central donde se encuentran los principales mecanismos fisiológicos de eliminación. De modo que los tejidos y secreciones del organismo pueden ser considerados un reservorio de fármaco, por lo que para un mismo aclaramiento plasmático, aquellos fármacos que tienen una amplia distribución tienden a permanecer más tiempo que otros que se distribuyen de manera más limitada (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b).

Teniendo en cuenta que en el primer día de tratamiento las AUC fueron mayores y la $t_{1/2\lambda_e}$ resultó menor que en el resto de los días, podemos hacer un análisis desde el punto de vista fisiológico para explicar estas observaciones. Tal como se explicó en el caso de las AUC, la menor producción láctea de los animales determinó un menor pasaje de MFX de la sangre hacia la glándula mamaria y la leche. De modo que, una mayor cantidad de MFX permanece en la sangre y queda disponible para ser eliminada, por lo que la permanencia (MRT) es menor que en el resto de los días, en los que al incrementarse la producción láctea, la distribución de MFX es mayor, así como la $t_{1/2\lambda_e}$ (tabla 45). Por otra parte, y en relación al MRT, no se observaron diferencias significativas entre el primer, tercer y quinto día de tratamiento; aunque nuevamente se observa una tendencia en la que el MRT aumenta durante los días de tratamiento de manera similar a la $t_{1/2\lambda_e}$. Como ambos parámetros representan la permanencia del fármaco en el organismo, probablemente la diferencia sea debida a la potencia del test de inferencia utilizado, por lo que al incrementar el número de animales el test estadístico se podría detectar diferencias significativas.

5.6.2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO EN LECHE

Tras la administración de MFX, 10 mg/kg/24h durante 5 días por vía IM, se observaron $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} lácticas ($31,44 \pm 4,32$ y $33,15 \pm 4,75$) aproximadamente dos veces mayores que las observadas en leche, tras la administración de 5 mg/kg IM en cabras lactantes sanas ($17,93 \pm 5,64$ y $18,25 \pm 5,55$, respectivamente). Las AUC de la dosis múltiple fueron aproximadamente 5 veces las reportadas por Fernández-Palacios (2013) tras una administración SC de 2 mg/kg de MFX en cabras lactantes. Estos resultados también están relacionados con la dosis administrada. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre las $AUC_{(0-t)}$ durante los diferentes días de tratamiento analizados, tanto en los medios sanos como en los infectados (tablas 39 y 40). Sin embargo, en los medios mamarios sanos puede observarse que $AUC_{(0-t)}$ presenta una tendencia a disminuir a medida que avanza el tratamiento, mientras que la producción láctea tiende a incrementarse (figura 20). El análisis de correlación mostró que la producción láctea se asoció con las $AUC_{(0-t)}$ en suero y en leche de los medios mamarios sanos, de manera que a medida que la producción láctea se vio incrementada durante el tratamiento, $AUC_{(0-t)}$ mostró una disminución progresiva (tabla 45). Estas observaciones

podrían ser explicadas por el paso de MFX de suero a leche de cabra, y al efecto de dilución que sucede al incrementar la producción láctea, por lo que la MFX se diluye en un mayor volumen lácteo (San Andrés y de Lucas, 2007). De esta manera, se observa una disminución de las AUC séricas y lácticas. Por otra parte, el cociente $AUC_{(0-t)}$ leche/suero en los medios mamarios sanos indica una excelente biodisponibilidad láctea de MFX durante todo el tratamiento. Nuestras observaciones coinciden con las de Fernández-Palacios (2013) tras una administración SC de 2 mg/kg MFX en cabras lactantes (tabla 42).

Con respecto a las $AUC_{(0-t)}$ y AUC_{∞} en los medios mamarios infectados, no se detectaron diferencias durante el tratamiento (tabla 43), y tampoco se evidenció una relación entre la producción láctea y estos parámetros, posiblemente debido a que en los medios mamarios infectados se observó un menor incremento en la producción láctea en comparación con los medios sanos (figura 20). El cociente $AUC_{(0-t)}$ leche/suero presentó una diferencia significativa en el primer día de tratamiento, con un valor de $0,86 \pm 0,12$, mientras que el resto de los días la relación fue superior a la unidad y no se observaron diferencias significativas (tabla 43). Esto podría reflejar que la MFX presentó una menor biodisponibilidad en leche el día 1^º. De todas maneras, no se observaron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos en leche ni en el cociente $AUC_{(0-t)}$ leche/suero, entre los medios sanos e infectados durante el tratamiento (tablas 40 y 44). Esto podría deberse a que el efecto de dilución sobre las concentraciones de la MFX en leche, derivado del incremento en la producción láctea, no sería lo suficientemente grande; aunque al final del tratamiento las AUC en los medios mamarios sanos presentarían un menor valor promedio con respecto a las de los medios infectados. Por otra parte, no se observaron indicios de una modificación de la permeabilidad de la MFX hacia los medios infectados, con respecto a los medios sanos, causado por la patología mamaria. Este hecho se ve reflejado en el cociente $AUC_{(0-t)}$ leche/suero. No se reportaron diferencias entre los medios mamarios sanos e infectados.

Tanto la C_{max} como la T_{max} en leche, no mostraron diferencias a lo largo del tratamiento, ni entre los medios mamarios sanos e infectados, ni tampoco entre los medios infectados. En general, la relación entre la C_{max} y la dosis administrada fue menor

a la observada tras la administración de una dosis única de 5 mg/kg de MFX (0,44 y 0,61, respectivamente).

La relación entre la C_{\max} y la dosis del régimen de dosis múltiple fue también menor a la calculada tras la administración SC (0,84) en cabras lactantes (Fernández-Palacios, 2013). Dado que las T_{\max} fueron similares, este fenómeno podría explicarse porque las C_{\max} de la MFX en suero ocurren aproximadamente a los 45 minutos, mientras que las T_{\max} en leche serían 2 o 3 horas. Este retraso debido a la distribución de MFX a leche de cabra, podría permitir que la MFX sea eliminada del compartimiento central, o bien que se distribuya a otros territorios orgánicos.

Con respecto a los parámetros de eliminación en leche $t_{1/2\lambda_e}$ y MRT, tanto en los medios mamarios sanos como los infectados se observó que λ_e y la $t_{1/2\lambda_e}$ fueron significativamente superiores el día 5º. Esto podría deberse a que el último día de tratamiento las muestras de leche se tomaron hasta las 48 horas, mientras que el resto de los días la última muestra de leche fue tomada a las 24 horas, ya que inmediatamente después se administraba la siguiente dosis de MFX. Por otra parte, el estado sanitario no influyó de manera significativa en dichos parámetros (tabla 41). Los índices $t_{1/2\lambda_e}$ leche/suero, siempre permanecieron cercanos a la unidad, salvo el día 3º, en el que la $t_{1/2\lambda_e}$ fue significativamente menor en leche que en suero.

En los medios mamarios sanos se observaron diferencias significativas en el MRT durante todos los días de tratamiento. Este incremento progresivo del MRT concuerda con el incremento de la producción láctea y con una disminución progresiva (aunque no significativa) de las AUC lácteas (tabla 39), debido a que el MRT guarda una relación inversa al AUC. Por el contrario, el MRT láctico en los medios mamarios enfermos no mostró diferencias significativas a lo largo del tratamiento, y estos datos concuerdan con un menor incremento en la producción láctea con respecto a los medios sanos, y valores similares de AUC lácticas (tabla 40). A su vez, los MRT observados en leche tras la administración IM de 10 mg/kg de MFX fueron superiores a los descritos tras una administración SC de 2 mg/kg, lo cual puede ser explicado por las diferentes dosis utilizadas en cada caso. Los cocientes MRT leche/suero resultaron significativos en todos los días de tratamiento, tanto para los medios sanos como los infectados.

El MRT láctico fue aproximadamente un 40% mayor que el sérico en todos los casos, indicando que MFX es eliminada más lentamente en leche; lo que indicaría un fenómeno

de atrapamiento. Estos datos concuerdan con los cocientes MRT leche/suero (superiores a la unidad), observados tras la administración IV e IM de 5 mg/kg de MFX; si bien tras la administración IM no se observaron diferencias significativas (tabla 32).

En resumen, tras la administración IM de 10 mg/kg/24h/5d, MFX mostró una buena biodisponibilidad láctea y una mayor permanencia en leche que en suero, tanto en los medios mamarios sanos como los infectados. Esto indicaría que el paso a leche de MFX no se ve afectado significativamente por la presencia de mastitis subclínica, por lo que se esperaría una eficacia óptima del esquema terapéutico de MFX.

Estos resultados son diferentes a los reportados por Gips y Soback (1999), que estudiaron el efecto de la mastitis subclínica y clínica sobre los parámetros farmacocinéticos en plasma y leche de norfloxacin en vacas lecheras. En dicho estudio, se observó una menor AUC en leche tanto en los animales con mastitis subclínica como clínica comparada con los sanos, mientras que el V_{ss} fue menor, así como la permanencia en el organismo (reflejada por un CI mayor y $t_{1/2\lambda e}$ y MRT menores en suero). Estas observaciones podrían deberse a una menor producción láctea, así como también en variaciones en el pH lácteo y sérico. Singh *et al.* (2010), evaluaron el efecto de la mastitis clínica sobre el comportamiento farmacocinético de gatifloxacin en cabras lactantes; encontrando un incremento en la permanencia de gatifloxacin en suero (incremento en la $t_{1/2\lambda e}$ y MRT); un mayor pasaje de gatofloxacin a leche de cabra y una mayor permanencia (C_{max} , AUC, MRT y $t_{1/2\lambda e}$ incrementadas, en leche), con un proceso de acumulación (cociente AUC leche/plasma de 2,34).

5.6.3. EVOLUCIÓN DEL pH LÁCTEO Y LA PRODUCCIÓN LÁCTEA

Se observó un aumento significativo en la producción láctea durante el tratamiento, tanto en los medios mamarios sanos como los infectados. Los medios mamarios sanos presentaron una mayor producción láctea que los infectados, durante todo el estudio. Una explicación posible podría ser que, cuando un medio mamario se encuentra infectado se generan mecanismos inflamatorios que podrían tener efecto en las glándulas no infectadas, como se describe en los trabajos de McDougall *et al.* (2010) y de Los Campos *et al.* (2006) en cabras. De esta manera, la infección subclínica en un medio mamario podría estar disminuyendo la producción del otro medio sano.

Tras la curación bacteriológica del medio mamario infectado, mediada por el tratamiento, la producción del medio sano se vio incrementada. Este incremento en la producción se relacionó a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos en suero y leche, que se discuten en los apartados anteriores. Además del incremento en la producción en los medios mamarios infectados, se observó un descenso del pH en los días 3º y 5º comparados con el primero. Esto puede relacionarse con la curación de la mastitis subclínica, ya que el pH no sufrió modificaciones en los medios sanos a lo largo del tratamiento. Estos datos concuerdan con los datos microbiológicos, ya que la mayoría de los animales presentaron cultivos negativos al cuarto día de tratamiento, mientras que dos lo hicieron al quinto día (figura 20; tabla 46).

5.6.4. CÁLCULO DE ÍNDICES DE EFICACIA, DEL RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE, POR VÍA INTRAMUSCULAR

Para el cálculo de los indicadores de eficacia PK/PD se integraron los datos de sensibilidad obtenidos de los patógenos regionales conjuntamente con los parámetros farmacocinéticos derivados del análisis sérico, tras el régimen IM de dosis múltiple.

Los criterios de $C_{\max}/CIM_{90} > 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 60$ se cumplieron en todos los animales durante todo el tratamiento (tablas 47-49). El primer día $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ fue significativamente más alto, respecto al tercer y quinto día. Esto se debe a que el primer día de tratamiento el $AUC_{(0-t)}$ sérica resultó significativamente mayor, debido a una menor producción láctea. Este hecho es favorable desde el punto de vista terapéutico para los antimicrobianos del tipo concentración dependientes, como la MFX.

C_{\max}/CIM_{90} no presentó diferencias significativas entre los días de tratamiento, el valor de significancia fue de $p = 0,06$. Esto también se observa para C_{\max} en suero, y los datos reflejan que la C_{\max} promedio del día 1 fue aparentemente mayor a las C_{\max} del resto de los días de tratamiento. La ausencia de diferencia observada podría deberse a una insuficiente potencia del test estadístico, por lo que probablemente al incrementar el número de animales se hubiera hecho evidente.

De acuerdo a una sustancial evidencia bibliográfica, C_{\max}/CIM_{90} y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ son indicadores de eficacia antimicrobiana relacionados con curación clínica y erradicación microbiológica, para quinolonas frente a diferentes patógenos (Forrest *et al.*, 1993; Forrest *et al.*, 1997; Lister, 2002; Toutain *et al.*, 2002; Drusano *et al.*, 2004; McKellar *et*

al., 2004). No obstante, los puntos de corte de estos parámetros relacionados no se encuentran del todo bien definidos en muchos casos, y de acuerdo a la evidencia científica obtenida hasta el momento, aparentemente estos puntos de corte pueden variar de acuerdo al patógeno en cuestión, tanto para organismos Gram negativos como Gram positivos, principalmente $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ (Lister y Sanders, 1999; Wright *et al.*, 2000; Ambrose, 2001; Lister, 2002; Drusano, 2007; Xiao y Xiao, 2008; Potter *et al.*, 2013). Dado que para fluoroquinolonas se aceptan puntos de corte de $C_{max}/CIM_{90} > 8 - 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 30 - 50$ (Lister, 2002; Drusano, 2007), para el desarrollo de este estudio se seleccionaron los puntos de corte más exigentes $C_{max}/CIM_{90} > 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 60$. De esta manera, como todos los animales del ensayo cumplieron con criterios de eficacia exigentes durante todo el tratamiento, podríamos afirmar que el esquema posológico utilizado de MFX a una dosis de 10 mg/kg, por vía IM, durante 5 días sería eficaz en el tratamiento de la mastitis subclínica producida por ECN y *S. aureus* en cabras en lactación.

Por otra parte, se calcularon los indicadores de eficacia C_{max}/CIM_{99} y $AUC_{(0-t)}/CIM_{99}$. Dado que el 8,50% de las cepas aisladas de ECN presentaron una CIM de 0,80 µg/ml, consideramos importante realizar el cálculo de los indicadores de eficacia para esta subpoblación, utilizando los datos farmacocinéticos del esquema posológico multidosis. Del mismo modo que con los indicadores C_{max}/CIM_{90} como $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$, se observaron diferencias significativas en $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$ en el primer día de tratamiento, aunque no se detectaron diferencias significativas en los indicadores C_{max}/CIM_{90} (nivel de significancia $p = 0,06$) los valores promedio del primer día del tratamiento aparentaron ser mayores a los correspondientes a los otros días. Como puede observarse en las tablas 47-49, tres de los siete animales presentaron valores de C_{max}/CIM_{99} inferiores a 8 en los días 1º y 3º, mientras que dos lo hicieron en el día 5º. De esta manera, en estos individuos el indicador C_{max}/CIM_{99} no cumple con los criterios de eficacia adecuados. Por otra parte, en el caso de los indicadores $AUC_{(0-t)}/CIM_{99}$, todos los animales presentaron valores de $AUC_{(0-t)}/CIM_{99} > 35$ en el día 1º de tratamiento, cinco en el día 3º y seis en el día 5º. Como se expuso anteriormente, se acepta que un $AUC_{(0-t)}/CIM$ entre 35 – 50 podría ser adecuado para organismos Gram positivos.

Con respecto a los criterios de eficacia más exigentes de $AUC_{(0-t)}/CIM > 60$, solo dos animales cumplieron con este criterio de eficacia en el primer y tercer día de

tratamiento, mientras que ninguno lo hizo el quinto día. De esta manera, podemos afirmar que muchos animales NO cumplieron con los criterios de eficacia más exigentes propuestos frente a patógenos con una CIM de 0,80 µg/ml. En aquellos animales que la C_{\max}/CIM_{99} no superó el valor de 8, en la mayoría de los casos el $AUC_{(0-t)}/CIM_{99}$ se encontró por encima de 35. Generalmente se acepta que cuando no se cumplen los criterios mínimos de eficacia para el indicador C_{\max}/CIM , el $AUC_{(0-t)}/CIM$ se transforma en el mejor predictor de eficacia antimicrobiana para quinolonas (Drusano *et al.*, 1993; Ambrose y Grasela, 2000). De esta manera, si bien no se cumplieron los criterios de eficacia más exigentes utilizados en esta tesis frente a patógenos con la CIM más elevada de 0,80 µg/ml, probablemente este esquema posológico podría ser eficaz para la mayoría de los casos de mastitis subclínica en cabras producida por estas cepas menos sensibles.

Los resultados del cálculo de los indicadores de prevención de selección de mutantes (tablas 50 a 55), realizados a partir de datos PD bibliográficos y los datos PK obtenidos tras la administración IM de 10 mg/kg de MFX, sugieren que:

Para el *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ($MPC_{90} = 3,50$ µg/ml), los valores de:

- C_{\max}/MPC_{90} se encontraron entre 1,47 y 4,10 ($3,04 \pm 1,14$) el día 1º, 1,42 y 3,63 ($2,58 \pm 0,77$) el día 3º y 1,58 y 2,53 ($2,22 \pm 0,28$) el día 5º.
- $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ se encontraron entre 9,33 y 15,52 ($12,42 \pm 2,38$) el día 1º; entre 6,09 y 14,25 ($9,96 \pm 3,39$) el día 3º; y 7,14 y 11,16 ($8,98 \pm 1,23$) el día 5º.
- T_{MSW} oscilaron entre el 29% y el 72% ($50 \pm 14\%$) el día 1º; entre un 20% y 85% ($39 \pm 23\%$) el día 3º y entre un 25% y 69% ($44 \pm 16\%$) el día 5º.

Para la cepa de *Staphylococcus pseudointermedius* ($MPC_{90} = 3,30$ µg/ml), los valores:

- C_{\max}/MPC_{90} se encontraron entre 1,56 y 4,35 ($3,22 \pm 1,21$) el día 1º; entre 1,51 y 3,85 ($2,74 \pm 0,82$) el día 3º y entre 1,68 y 2,68 ($2,36 \pm 0,29$) el día 5º.
- $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ osciló entre 9,90 y 16,46 ($13,17 \pm 2,52$) el día 1º; entre 6,46 y 15,11 ($10,56 \pm 3,60$) el día 3º; y entre 7,57 y 11,84 ($9,53 \pm 1,31$) el día 5º.
- T_{MSW} estuvo entre 29% y 71% ($49 \pm 14\%$) el día 1º; entre 19% y 84% ($39 \pm 24\%$) el día 3º; y entre 24% y 68% ($42 \pm 17\%$) el día 5º.

Para las cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis caprinas ($MPC_{90} = 1,00$ µg/ml), los valores:

- C_{\max}/MPC_{90} se encontró entre 5,14 y 14,34 ($10,64 \pm 3,98$) el día 1º; entre 4,98 y 12,69 ($9,03 \pm 2,70$) el día 3º y entre 5,53 y 8,85 ($7,78 \pm 0,97$) el día 5º.
- $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ varió entre 32,66 y 54,32 ($43,46 \pm 8,32$) el día 1º; entre 21,32 y 49,87 ($34,86 \pm 11,88$) el día 3º; y entre 24,99 y 39,07 ($31,44 \pm 4,32$) el día 5º.
- T_{MSW} entre 13% y 30% ($24 \pm 6\%$) el día 1º; entre 6% y 30% ($12 \pm 8\%$) el día 3º y entre 7% y 36% ($18 \pm 9\%$) el día 5º.

Por último, la cepa ATCC 25922 ($MPC_{90} = 0,50 \mu\text{g/ml}$) presentó los valores:

- C_{\max}/MPC_{90} entre 10,28 y 28,69 ($21,27 \pm 7,96$) el día 1º; entre 9,96 y 25,39 ($18,06 \pm 5,40$) el día 3º; y entre 11,07 y 17,71 ($15,55 \pm 1,93$) el día 5º.
- $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ osciló entre 65,32 y 108,64 ($86,92 \pm 16,64$) el día 1º; entre 42,65 y 99,64 ($69,72 \pm 23,76$) el día 3º; y entre 49,98 y 78,14 ($62,89 \pm 8,64$) el día 5º.
- T_{MSW} estuvo entre 13% y 30% ($24 \pm 6\%$) el día 1º; entre 115 y 40% ($27 \pm 11\%$) el día 3º; y entre 13% y 35% ($24 \pm 9\%$) el día 5º.

A la vista de estos valores puede resumirse que, tras una dosis de 10 mg/kg de MFX por vía IM en un régimen de dosis múltiple, se observa que para las cepas con MPC_{90} de 3,50 y 3,30 $\mu\text{g/ml}$ los valores de C_{\max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ resultaron mucho mayores durante todo el tratamiento que tras la administración de 5 mg/kg por vía IM. Sin embargo, los valores de T_{MSW} no fueron más adecuados, de hecho se vieron incrementados un 18% y un 22%, respectivamente, en comparación con los T_{MSW} de la dosis de 5 mg/kg. Por el contrario, para las cepas con MPC_{90} de 1,00 y 0,50 $\mu\text{g/ml}$ los valores de los indicadores C_{\max}/MPC_{90} y $AUC_{(0-t)}/MPC_{90}$ se incrementaron de manera proporcional a la dosis, pero el T_{MSW} se incrementó en mayor medida que con las cepas menos sensibles (28% y 25%, en comparación con la dosis de 5 mg/kg). La explicación a este hecho podría deberse a que tras la administración de 10 mg/kg de MFX, los valores de C_{\max} y $AUC_{(0-t)}$ son aproximadamente el doble que tras la administración de 5 mg/kg. De esta manera, los índices que dependen de estos parámetros farmacocinéticos se incrementarán proporcionalmente. Sin embargo, la $t_{1/2\lambda_e}$ y el MRT promedio fueron de 4,25 y 4,72 h tras la dosis de 5 mg/kg *versus* 6,52 y 6,26 h tras administración de 10 mg/kg; acompañado de concentraciones más altas a las 24 horas, lo cual incrementa el T_{MSW} , ya que las pendientes de eliminación son menores. De modo que, por una parte los indicadores basados en la C_{\max} y el $AUC_{(0-t)}$ mejoraron significativamente, pero por

otra los T_{MSW} empeoraron, siendo los más afectados los de las cepas más bajas. Probablemente debido a que las pendientes de eliminación, correspondientes al intervalo de tiempo donde se encuentran las MSW en las cepas con MPC_{90} más elevadas, son mayores que las observadas con MPC_{90} más bajas; dado que la curva de concentración vs tiempo de MFX tiende a aplanarse en la fase tardía de eliminación. De esta manera, los indicadores de prevención de selección de mutantes serían adecuados tras una administración de 10 mg/kg de MFX durante todo el tratamiento para las cepas con MPC_{90} más bajas, mientras que se encontrarían al límite de lo óptimo para las cepas con MPC_{90} de 3,30 $\mu\text{g/ml}$ y 3,50 $\mu\text{g/ml}$, principalmente por los valores de T_{MSW} superiores al 20% del intervalo de dosis. Como mencionamos anteriormente, dado que los puntos de corte de estos indicadores PK/PD no están bien definidos todavía, no se pueden extraer conclusiones definitivas. Por otra parte existe la limitación derivada de que solo las cepas de *Staphylococcus aureus* fueran específicas.

Al correlacionar los resultados de indicadores PK/PD de eficacia y de prevención de selección de mutantes, con los datos de curación microbiológica (obtenidos a partir de los cultivos de leche del medio mamario enfermo vs sano), puede observarse que existe una relación entre ellos, dado que todos los animales alcanzaron la curación microbiológica tras el tratamiento. De esta manera, los datos de curación microbiológica dan crédito a los indicadores de eficacia y de prevención de resistencias. Es necesaria mayor evidencia mediante ensayo clínico y disponer de datos PD obtenidos a partir de cepas caprinas, para poder determinar los puntos de corte de los indicadores de prevención de selección de mutantes.

En resumen, el régimen posológico multidosis propuesto en el presente estudio para MFX, de 10 mg/kg/día durante 5 días para el tratamiento de la mastitis subclínica producida por ECN y *S. aureus* en cabras de la región de la Provincia de Córdoba (Argentina), resultó ser óptimo desde el punto de vista terapéutico (eficacia clínica y bacteriológica).

VI. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El análisis farmacocinético de las muestras séricas, tomadas tras administración de dosis única de marbofloxacin (5 mg/kg) en forma de bolo por vía IV e IM, mostró en cabras sanas una excelente biodisponibilidad IM y una buena distribución orgánica. La permanencia de marbofloxacin basada en el tiempo medio de residencia, obtenida en cabras en lactación (MRT), en relación a la dosis ensayada y en comparación con los datos publicados para otras fluoroquinolonas, fue superior a moxifloxacin, orbifloxacin y pefloxacin, similar a levofloxacin y menor que difloxacin.
2. El análisis farmacocinético de las muestras de leche, recolectadas tras administración de dosis única de Marbofloxacin (5 mg/kg) en forma de bolo por vía IV e IM, mostró en cabras sanas una biodisponibilidad cercana al 100%; mostrando un tiempo medio de residencia mayor en leche que en suero.
3. Los parámetros de sensibilidad antimicrobiana, para cepas regionales de estafilococos coagulasa negativos productores de mastitis subclínica y para *S. aureus*, aislados de la leche de cabras, procedentes de hatos localizados en la provincia de Córdoba (Argentina), mostraron proximidad entre los valores CIM₅₀ y CIM₉₀ (0,20 µg/ml vs 0,40 µg/ml). Lo cual sugiere escaso desarrollo de mecanismos de resistencia ante Marbofloxacin, probablemente asociada a una casi inexistente presión terapéutica en la zona de estudio.
4. Los índices de eficacia antimicrobiana PK/PD (C_{max}/CIM_{90} y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90}$) obtenidos tras administración de dosis única de 5mg/kg, no alcanzaron adecuadamente los puntos de corte seleccionados en este estudio ($C_{max}/CIM_{90} > 10$ y $AUC_{(0-t)}/CIM_{90} > 60$).
5. La simulación realizada a partir de la integración de parámetros farmacocinéticos y de sensibilidad antimicrobiana de los patógenos regionales, predijo una dosis eficaz de marbofloxacin de 10 mg/kg/24h, por vía IM, para el tratamiento de mastitis caprinas producidas por cepas regionales de *S. aureus* y ECN.

6. El análisis farmacocinético de las muestras séricas, tomadas tras administración de dosis múltiple de marbofloxacin (10 mg/kg), por vía IM, durante 5 días en cabras con mastitis subclínica, mostró una excelente biodisponibilidad IM cercana al 100%. Se aprecia un comportamiento lineal entre las dosis evaluadas y el AUC. No se observó un efecto de acumulación de Marbofloxacin en suero.

7. Marbofloxacin presentó muy buena difusión desde la sangre hacia la leche de las cabras con mastitis subclínica, con índices $AUC_{(0-t)}$ leche/suero cercanos a la unidad, tanto en el medio mamario infectado como en el medio mamario sano (patrón). Las AUC_{leche} mostraron una tendencia a disminuir a lo largo del tratamiento, que coincide con un incremento de producción láctea.

8. El grado de inflamación mamaria presente en el proceso subclínico, no produjo modificaciones en la permeabilidad de la barrera hematoglandular. Las modificaciones en el pH lácteo no mostraron incidencia significativa sobre los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin, entre los medios mamarios sanos e infectados.

El esquema posológico, 10 mg/kg/24 h/5 días por vía IM de MFX, propuesto para el tratamiento de mastitis subclínica, producida por ECN y *S. aureus*, demostró ser eficaz y seguro en los animales estudiados. Siendo evidencias clínicas: el incremento de la producción láctea de los animales, a lo largo del tratamiento; la desaparición de las diferencias de producción entre los medios mamarios sanos e infectados (entre los días 3º y 5º); el descenso progresivo del pH lácteo, en los medios mamarios infectados; y la ausencia de agentes infecciosos en los cultivos microbiológicos del medio mamario afectado de las cabras (entre los días 4º y 5º). Es necesario realizar ensayos clínicos, en un mayor número de animales.

9. A las dosis ensayadas de 10 mg/kg/24 h/5 días, por vía IM, los indicadores de prevención de selección de mutantes AUC/MPC sería válidos para las cepas más sensibles, con valores de MPC_{90} de 1,00 y 0,50 µg/ml.

10. Es necesario practicar un uso prudente de Marbofloxacin en cabras.

VII. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Aty, A. M. y Goudah, A. (2002). Some pharmacokinetics parameters of pefloxacin in lactating goats. *Veterinary Research Communications*. **26**: 553 – 561.
- Abo El-Sooud, K. y Goudah, A. (2009). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of difloxacin in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Journal*. **179**:2: 282 - 286.
- Agencia Española del Medicamento. (2009). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Resumen de las características del producto. Marbofloxacin.
<https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2014/4/28/67459.pdf>.
Consultado: 2 de noviembre de 2015.
- Albarellos, G. A.; Montoya, L. y Landoni, M. F. (2005). Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *The Veterinary Journal*. **170**: 222 – 29.
- Aleixandre, A. y Puerro, M. (2005). Absorción y distribución de los fármacos. En: *Farmacología básica y clínica*. 17ª Ed. Velázquez L., P.; Moreno, A.; Leza, J. C.; Lisazoain, I. y Moro, M. A. Editorial Panamericana. Madrid, España. **15 – 38**.
- Aliabadi, F. S. y Lees, P. (2002). Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **25**(3): 161 – 174.
- Ambrose, P. G. y Grasela, D. M. (2000). The use of Monte Carlo simulation to examine pharmacodynamic variance of drugs: fluoroquinolone pharmacodynamics against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **38**(3). 151–157.
- Ambrose, P. G.; Grasela, D. M.; Grasela, T. H.; Passarell, J.; Mayer, H. B. y Pierce, P. F. (2001). Pharmacodynamics of fluoroquinolones against

Streptococcus pneumoniae in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45(10): 2793 – 2797**.

- Anadón, A.; Martínez Larrañaga, M. R.; Iturbe, J.; Martínez, M. A.; Diaz, M. J.; Frejo, M. T.; Martínez, M. (2001). Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. **71:2. 101 - 109**.
- Appelbaum, P. C. y Hunter P. A. (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **16: 5 – 15**.
- Arias, M. y Alonso, A. (2002). Estudio sobre sistemas caprinos del norte de la provincia de Córdoba, Argentina. *Archivos de Zootecnia*. **51 (195): 341 – 349**.
- Armijo, J. A. (2004). Farmacocinética: absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: *Farmacología humana* 4ª edición. Flórez, J.; Armijo, J. A. y Mediavilla, A. Masson. Barcelona, España. **51 – 80**.
- Awji, E. G.; Tassew, D. D.; Lee, J.; Lee, S.; Choi, M.; Reza, A.; Rhee, M.; Kim, T. y Park, S. (2012). Comparative mutant prevention concentration and mechanism of resistance to veterinary fluoroquinolones in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*. **23: 369 –376**.
- Azanza, J. R.; Sábada, B.; Mediavilla, A. y Flórez, J. (2000). Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Clotrimazol. Nitrofurantoína. Antisépticos. En: Flórez, J.; Armijo, J. A. y Mediavilla, A. *Farmacología Humana* 4ª Ed. Ed.: Masson. Barcelona, España. **1169 – 1200**.
- Bedolla, C.; Bedolla, E. A.; Castañeda, H.; Wolter, W.; Castañeda, M. A. y Kloppert, B. (2012). Mastitis Caprina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/9014/pdf/BedollaCedenoMastitis_Caprina2012.pdf. Consultado: 2 de noviembre de 2015.

- Bedotti, D. y Sánchez Rodríguez, M. (2004). Aproximación a la problemática sanitaria del ganado caprino en el oeste pampeano. Investigación en producción animal 2002-2003, región subhúmeda y semiárida pampeana. Boletín de divulgación técnica INTA Anguil. **79: 120 - 129.**
- Begg, E. J.; Atkinson, H. C. y Duffull, S. B. (1992). Prospective evaluation of a model for the prediction of milk: plasma drug concentrations from physicochemical characteristics. British Journal of Clinical Pharmacology. **33. 501-505.**
- Belew, S.; Kim, J.; Hossain, M.; Park, J.; Lee, S.; Park, Y.; Suh, J.; Kim, J. y Park, S. (2015). Pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Hanwoo, Korean native cattle. The Journal of Veterinary Medical Science. **77(3): 327 – 329.**
- Bennett, J. V.; Brodie, J. L.; Benner, E. J. y Kirby, W. M. M. (1966). Simplified, Accurate Method for Antibiotic Assay of Clinical Specimens. Applied Microbiology. **14(2): 170 – 177.**
- Bergonier, D.; De Cremoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G. y Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. Veterinary Research. **34: 689 – 716.**
- Bermingham, E.C. and Papich, M.G. (2002). Pharmacokinetics after intravenous and oral administration of enrofloxacin in sheep. American Journal of Veterinary Research. **63(7): 1012 – 1017.**
- Bidgood, T. L. y Papich, M. G. (2005). Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **28(4): 329 - 341.**
- Blondeau, J. M. (2004). Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. Survey of Ophthalmology. **49(2): 573 – 78.**

- Boerlin, P. y White, D. G. (2006). Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine 4th edition. Giguère, S.; Prescott, J. F.; Baggot, J. D.; Walker, R. D. y Dowling, P. M. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, U.S.A. **263 – 284**.
- Bolon, M. K. (2011). The Newer Fluoroquinolones. Medical Clinics of North America. **95: 793 – 817**.
- Bousquet-Mélou, A.; Bernard, S.; Schneider, M. y Toutain, P. L. (2002). Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. Equine Veterinary Journal. **34(4): 366 – 72**.
- Bregante, M. A.; Saez, P.; Aramayona, J. J.; Fraile, L.; Garcia, M. A. y Solans, C. (1999). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep, and cows. American Journal of Veterinary Research. **60(9): 1111 - 1116**.
- Bywater, R.; Silley, P. y Simjee, S. (2006). Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements. Veterinary Microbiology. **118(1-2): 158 - 159**.
- Canut-Blasco, A.; Aguilar-Alfaro, L.; Cobo-Reinoso, J.; Giménez-Mestre, M. J. y Rodríguez-Gascón, A. (2015). Análisis farmacocinético/farmacodinámico En Microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **33(1): 48 – 57**.
- Cao, C.; Qu, Y.; Sun, M.; Qiu, Z.; Huang, X.; Huai, B.; Lu, Y. y Zeng, Z. (2015). *In vivo* antimicrobial activity of marbofloxacin against *Pasteurella multocida* in a tissue cage model in calves. Frontiers in Microbiology. **6:759**.
- Cárceles, C. M., Escudero, E., Fernandez-Varon, E. y Marin, P. (2009). Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of moxifloxacin in sheep. Veterinary Journal. **180(3): 343 – 347**.
- Carpenter, J. W., Pollock, C. G., Koch, D. E. y Hunter, R. P. (2009). Single and multiple-dose pharmacokinetics of marbofloxacin after oral administration to rabbits. American Journal of Veterinary Research. **70(4): 522 – 526**.
- Carretero, M.; Rodríguez, C.; San Andrés, M. I.; Fores, P.; de Lucas, J. J.; Nieto, J.; Waxman, S.; San Andrés, M. D. y González, F. (2002). Pharmacokinetics of

marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*. **34(4): 360 - 365.**

- Cester, C.C.; Schneider, M. y Toutain, P. L. (1996). Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: enrofloxacin *versus* marbofloxacin. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **147: 703 – 716.**
- CLSI. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Contreras, A.; Sierra, D.; Sánchez, A.; Corrales, J. C.; Marco, J. C.; Paape, M. J. y Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. **68: 145 – 153.**
- Corrales, J. C.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Luengo, C. y Marco, J. C. (1997). Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. *Ovis*. **53: 33 - 65.**
- Corrales, J. C.; Sanchez, A.; Luengo, C. y Contreras, A. (1998). Tratamiento de las mamitis caprinas y otras estrategias de control. *Ovis*. **54: 83 – 92.**
- Corrales, J. C.; Sanchez, A.; Luengo, C.; Poveda, J. B. y Contreras, A. (2004). Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano – Granadina goat herds. *Journal of Dairy Science*. **87: 3165 – 3171.**
- Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S. y Wood Jr., B. W. (1968). *Principles of Microbiology and Immunology*. Harper & Row. New York, U.S.A. **854.**
- Davis, J. L., Foster, D. M. and Papich, M. G. (2007). Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **30(6): 564 – 571.**
- De Lucas, J.J., Navarro, J.L., Rubio, S., Vignolo, P.E., Asis, V.C., González, F. y Rodríguez, C. (2008) Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin in greater rheas following a single-dose intramuscular administration. *Veterinary Journal*. **175(1): 136 – 138.**

- De Los Campos, G.; Gianola, D.; Boettcher, P. y Moroni, P. (2006). A structural equation model for describing relationships between somatic cell score and milk yield in dairy goats. *Journal of Animal Science*. **84**: 2934–2941.
- Dimitrova, D. J.; Lashev, L. D.; Yanev, S. G. y Pandova, B. (2007). Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Research in Veterinary Science*. **82**:3. 392 - 397.
- Ding, H.; Li, Y.; Chen, Z.; Rizwan-ul-Haq, M. y Zeng, Z. (2010). Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular, and oral single-dose application in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **33**(5): 507 – 510.
- Doorsaler, X.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H. y Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Science of The Total Environment*. **500–501**: 250 – 269.
- Drusano, G. L.; Johnson, D. E.; Rosen, M. y Standiford, H. C. (1993). Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **37**(3): 483 – 490.
- Drusano, G. L.; Preston, S. L.; Fowler, C.; Corrado, M.; Weisinger, B. y Kahn, J. (2004). Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*. **189**: 1590 – 1597.
- Drusano, G. L. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clinical Infectious Diseases*. **45**(1): 89 – 95.
- EFSA. (2009). European Medicines Agency Reference EMEA/CVMP/447259/2009. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1372.pdf. Consultado: 2 de noviembre de 2015.

- EMEA. (1996). The European Agency for Evaluation for medicinal products. EMEA/MRL/079/96-FINAL. Marbofloxacin Summary Report. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014864.pdf. Consultado: 02 de noviembre de 2015.
- EMEA/CVMP/133/99-FINAL. (1999). Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal-species. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004355.pdf. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- EMEA. (1999). The European Agency for Evaluation for medicinal products. EMEA/CVMP/342/99-corr-FINAL. Antibiotic resistance in the European Union Associated with the therapeutic use of veterinary medicines. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- EMEA. (2000). The European Agency for Evaluation for medicinal products. EMEA/MRL/693/99-FINAL. Marbofloxacin Summary Report (2). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014865.pdf. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL. (2000). Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal-products. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004304.pdf. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. (2009). Guideline on validation of bioanalytical-methods. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf. Consultado: 2 de noviembre de 2015.
- Escudero, E.; Cárceles, C. M.; Fernández Varón, E.; Marin, P. y Benchaoui, H. (2007). Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **30(6): 572 – 577**.

- Ensminger, M. E. y Parker R. O. (1986). Sheep and Goat Science. The Interstate Printers and Publishers Inc. Danville, Illinois, U.S.A. **643**.
- FAOSTAT. (2012a). Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- FAOSTAT. (2012b). Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Fernández-Palacios O'Connor, R. (2013). Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación controlada para Marbofloxacin en caprino. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España. <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/37879/1/Tesis%20Roc%C3%ADo%20Fern%C3%A1ndez-Palacios%20O%C2%B4connor.pdf> Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Fernández Varón, E.; Villamayor, L.; Escudero, E.; Espuny, A. y Cárceles, C. M. (2006). Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intravenous and subcutaneous administration to lactating goats. The Veterinary Journal. **172: 302 – 307**.
- Ferran, A.; Dupouy, V.; Toutain, P. L. y Bousquet-Mélou, A. (2007). Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **51(11): 4163 – 4166**.
- Firsov, A. A.; Vostrov, S. N.; Lubenko, I. Y.; Drlica, K.; Portnoy, Y. A. y Zinner, S. H. (2003). *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **47(5): 1604 – 1613**.
- Fish, D. N. (2001). Fluoroquinolone adverse effects and drug interactions. Pharmacotherapy. **21(10 Pt2): 253s – 272s**.

- Forrest, A.; Nix, D. E.; Ballow, C. H.; Goss, T. F.; Birmingham, M. C. y Schentag, J. J. (1993). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **37**: **1073 – 81**.
- Forrest, A.; Chodosh, S.; Amantea, M. A.; Collins, D. A. y Schentag, J. J. (1997). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. **40(A)**: **45 – 57**.
- Frazier, D. L.; Thompson, L.; Trettien, A. y Evans, E. I. (2000). Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **23(5)**: **293 – 302**.
- Giguère, S. y Dowling, P. M. (2013). Fluoroquinolones. In: Giguère, S.; Prescott, J. F. y Dowling, P. M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th Edition. Ed: Wiley – Blackwell. Iowa. U.S.A. **295 – 314**.
- Gips, M. y Soback, S. (1999). Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **22(3)**: **202 – 208**.
- GLP. (2004). Directive of the European Parliament and of the Council. 2004/9/EC. 11 February. The inspection and verification of good laboratory practice.
<http://register.consilium.europa.eu/doc/srv?l=EN&f=ST%203653%202003%20REV%201>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Gobernado, M. y Santos, M. (2002). Quinolonas. En: Tratamiento antimicrobiano 3ª Edición. Ed.: Drobic L. Ergon. Madrid, España. **323 – 348**.
- Gómez-Martín, A.; Amores, J.; Paterna, A. y De la Fe, C. (2013). Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *The Veterinary Journal*. **198**: **48 – 56**.

- González Gómez, F. y Nieto Martínez, J. (2007). Quinolonas y fluoroquinolonas. En: Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. San Andrés Larrea, M. y Boggio, J. C. Editorial Inter-Médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **249 – 262.**
- Goudah, A. y Abo El-Sooud, K. (2008). Pharmacokinetics, urinary excretion and milk penetration of levofloxacin in lactating goats. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **32(1): 101 – 104.**
- Haritova, A.; Lashev, L. y Pashov, D. (2003). Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep. Research in Veterinary Science. **74: 241–245.**
- Heinen, E. (2002). Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin and orbifloxacin in dogs after single oral administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **25(1): 1 – 5.**
- Higgins, P. G.; Coleman, K. y Amyes, S. G. (2000). Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp in vitro. Journal of Antimicrobials and Chemotherapy. **45(1): 71 - 77.**
- Homma, T.; Hori, T.; Sugimori, G. y Yamano, Y. (2007). Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **51(11): 3810 – 3815.**
- Humphries, R. M.; Fang, F. C.; Aarestrup, F. M. y Hindler, J. A. (2012). In Vitro Susceptibility Testing of Fluoroquinolone Activity Against Salmonella: Recent Changes to CLSI Standards. Clinical Practice. **55: 1107 – 13.**
- Illambas, J.; Potter, T.; Cheng, Z.; Rycroft, A.; Fishwick, J. y Lees, P. (2013). Pharmacodynamics of marbofloxacin for calf pneumonia pathogens. Research in Veterinary Science. **94(3): 675 – 681.**
- Ismail, M. y El-Kattan, Y. A. (2007). Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and *Mannheimia haemolytica* infected calves. Research in Veterinary Science. **82: 398 – 404.**

- Jiménez Lozano, E.; Marqués, I.; Barrón, D.; Beltrán, J. L. y Barbosa, J. (2002). Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta*. **464**: 37 – 45.
- Kaartinen, L.; Salonen, M.; Alli, L. y Pyorala, S. (1995). Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **18(5)**: 357 – 362.
- Kao, C. Y. y Wu, J. J. (2015). The Challenge of Fluoroquinolone Resistance: Epidemiology, Mechanisms, and Clinical Impact. *Journal of Biomedical and Laboratory Sciences*. **27(3)**: 77 – 86.
- Kitamura, Y.; Yoshida, K.; Kusama, M. y Sugiyama, Y. (2014). A proposal of a pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) index map for selecting an optimal PK/PD index from conventional indices (AUC/MIC, Cmax/MIC and TAM) for antibiotics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. **29(6)**: 455 – 462.
- Körber-Irrgang, B.; Wetzstein, H. G.; Bagel-Trah, S.; Hafner, D. y Kresken, M. (2012). Comparative activity of pradofloxacin and marbofloxacin against coagulase-positive staphylococci in a pharmacokinetic pharmacodynamic model based on canine pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **35(6)**: 571 – 579.
- Kroemer, S.; El Garch, F.; Galland, D.; Petit, J. L.; Frédérique Woehrle, F. y Boulouis, H. J. (2014). Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002–2009). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **37**: 97– 108.
- Liang, B.; Bai, N.; Cai, Y.; Wang, R.; Drlica, K. y Zhao, X. (2011). Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55(5)**: 2409 – 2412.

- Lister, P. D. y Sanders, C. C. (1999). Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **43(1): 79 – 86.**
- Lister, P. D. (2002). Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **46(1): 69 – 74.**
- Litterio, N. J.; Calvino, L. F.; Flores, M. M.; Tarabla, H. D. y Boggio, J. C. (2007). Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. Journal of Veterinary Medicine; Series A. **54(1): 30 – 35.**
- Liu, H.; Liu, X.; Li, Y. y Hao, C. (2015). Effect of six fluoroquinolones on the expression of four efflux pumps in the multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **31: 1041 – 1048.**
- Lhermie, G.; El-Garch, F.; Toutain, P. L.; Ferran, A. A. y Bousquet-Mélou, A. (2015). Bacterial Species-Specific Activity of a Fluoroquinolone against Two Closely Related *Pasteurellaceae* with Similar MICs: Differential *In Vitro* Inoculum Effects and *In Vivo* Efficacies. PLoS ONE 10(10): e0141441. doi:10.1371/journal.pone.0141441
- Loncaric, I.; Brunthaler, R. y Spengler, J. (2013). Suspected Goat-to-Human Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398. Journal of Clinical Microbiology. **51(5): 1625 – 1626.**
- Lorenzutti, A. M. (2009). Farmacocinética de marbofloxacin en cabras: análisis microbiológico versus cromatográfico. Proyecto de investigación para optar a la obtención del DEA. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. (Inédito).
- Lucas, M. F.; Errecalde, J. O. y Mestorino, N. (2010). Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **33(2): 132 - 140.**

- MacGowan, A. P. y Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother.* **48(1): 17 - 28.**
- MAGyP. (2006). Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/120000-124999/120041/norma.html>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Marín, P.; Cárceles, C. M.; Escudero, E. y Fernández Varón, E. (2007a). Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* **71: 74 – 76.**
- Marín, P.; Escudero, E.; Fernández Varón, E. y Cárceles, C. M. (2007b). Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. *Journal of Dairy Science.* **90: 4219 – 4225.**
- Marín, P.; Escudero, E.; Fernández Varón, E. y Cárceles, C. M. (2007c). Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics.* **30(1): 74 – 79.**
- Marín, P.; Escudero, E.; Fernández-Varón, E.; Cárceles, C. M.; Corrales, J. C.; Gómez-Martín, A. y Martínez, I. (2010). Short communication: Fluoroquinolone susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. *Journal of Dairy Science.* **93: 5243 – 5245.**
- Martinez, M.; McDermott, P. y Robert Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal.* **172: 10–28.**
- Matta, A.; Etchegorry, C.; Magnano, C.; Orchansky, C.; Suárez, G. y Paiva, E. (2007). Estrategias comerciales para el sector caprino. Estudio de caso de la cadena caprina. Agencia para el Desarrollo Económico de la Ciudad de Córdoba. Programa de Desarrollo de Cadenas Productivas en la Provincia de Córdoba. **81.**

- McDougall, S.; De Vliegher, S.; Haesebrouck, F.; Hussein, H.; Clausen, L. y Prosser, C. (2010). Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. **93**: 4710 – 4721.
- McKellar, Q. A.; Sanchez Bruni, S. F. y Jones, D. G. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **27(6)**: 503 – 14.
- McKellar, Q. A. y Boggio, J. C. (2007). Relación farmacocinética/farmacodinámica de fármacos antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria. En: *Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria*. San Andrés Larrea, M. y Boggio, J. C. Editorial Inter-Médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **25 – 30**.
- Meunier, D.; Acar, J. F.; Martel, J. L.; Kroemer, S. y Valle, M. (2004). Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **24**: 70 – 80.
- Mouton, J. W.; Dudley, M. N.; Cars, O.; Derendorf, H. y Drusano, G. L. (2002). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **19**: 355 – 58.
- Mouton, J. W.; Dudley, M. N.; Cars, O.; Derendorf, H. y Drusano, G. L. (2005). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **55**: 601 – 607.
- Oliphant, C. M. y Green, G. M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician*. **65(3)**: 455 – 64.
- Oliver, S.P.; Gonzalez, R. N.; Hogan, J. S.; Jayarao, B. M. y Owens, W. E. (2004). Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th edition ed. Verona, WI. National Mastitis Council.

- Olofsson, S. K.; Marcusson, L. L.; Stromback, A.; Hughes, D. y Cars. O. (2007). Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **60: 795 – 801.**
- Papich, M. G. y Riviere, J. E. (2009). Chapter 38: Fluoroquinolone Antimicrobial Drugs. In: Riviere, J. E. y Papich, M. G. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 9th edition. Wiley – Blackwell. Ames, Iowa, U.S.A. **983 – 1012.**
- Papich, M. G. (2013). Antimicrobials, Susceptibility Testing, and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in Veterinary Infection Treatment. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. **43: 1079 – 1089.**
- Papich, M. G. (2014). Pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. Veterinary Microbiology **171: 480 – 486.**
- Pastor, A. y Cantón, E. (1999). Interacciones de las bacterias y el antimicrobiano durante la fase de efecto post-antibiótico. Revista Española de Quimioterápicos. **12(4).**
- Plachouras, D.; Antoniadou, A.; Giannitsioti, A.; Galani, L.; Katsarolis, I.; Kavatha, D.; Koukos, G.; Panagopoulos, P.; Papadopoulos, A.; Poulakou, G.; Sakka, V.; Souli, M.; Sybardi, S.; Tsiodras, S.; Kanellakopoulou, K. y Giamarellou, H. (2015). Promoting prudent use of antibiotics: the experience from a multifaceted regionalvcampaign in Greece. BMC Public Health. **14: 866.**
- Potter, T.; Illambas, J.; Pelligand, L.; Rycroft, A. y Lees, P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. The Veterinary Journal. **195(1): 53 – 58.**
- Riviere, J. E. (2009). Chapter 2: Absorption, distribution, metabolism, and elimination. In: Riviere, J. E. y Papich, M. G. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 9th edition. Wiley – Blackwell. Ames, Iowa, U.S.A. **11 – 46.**
- Rossanigo, C. E. y Sager R. L. (2002). Casuística diagnóstica del ganado caprino en el centro-oeste de la Argentina. XIV Reunión Científico-Técnica de la

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico. Villa General Belgrano, Prov. de Córdoba, 13 al 15 de noviembre de 2002.

- Rowland, M. y Tozer, T. N. (1995). Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications. 3rd edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA. **19106 – 3621**.
- San Andrés, M. D. y de Lucas, J. J. (2007). Paso de los antimicrobianos a través de las barreras biológicas. En: San Andrés Larrea, M. y Boggio, J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Editorial Inter-Médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **33 – 53**.
- San Andrés, M. I. y Boggio, J. C. (2007). Introducción a los antimicrobianos. En: San Andrés, M. I. y Boggio, J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Editorial Inter-Médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **1 – 24**.
- Sánchez, A.; Corrales, J. C.; Marco, J. y Contreras, A. (1998). Aplicación del recuento de células somáticas para el control de las mastitis caprinas. Ovis. **54: 37 – 51**.
- Schneider, M.; Thomas, V.; Boisrame, B. y Defeforge, J. (1996). Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **19(1): 56 – 61**.
- Schneider, M.; Valle, M.; Woehrle, F. y Boisrame, B. (2004). Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. Journal of Dairy Science. **87: 202 – 211**.
- Scott, L. C. y Menzies, P. I. (2011). Antimicrobial Resistance and Small Ruminant Veterinary Practice. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. **27(1): 23 – 32**.

- Shearer, J. K. y Harris, B. J. (2003). Mastitis in dairy goats. Animal Science Department. Florida Coop. Extension Services. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Gainesville, USA. **1 - 6.**
- Shem-Tov, M.; Ziv, G.; Glickman, A. y Saran, A. (1997). Pharmacokinetics and Penetration of Marbofloxacin from Blood into the Milk of Cows and Ewes. Journal of Veterinary Medicine. Series A. **44(1-10): 511 – 519.**
- Shem-Tov, M.; Ziv, G.; Glickman, A. y Saran, A. (1998). Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **21(3): 209 – 213.**
- Sidhu, P. K.; Landoni, M. F.; Aliabadi, F. S. y Lees, P. (2010a). PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. Research in Veterinary Science. **88: 134 – 141.**
- Sidhu, P. K.; Landoni, M. F.; Ali-Abadi, F. S. y Lees, P. (2010b). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in goats. The Veterinary Journal. **184: 219 – 229.**
- Sidhu, P. K.; Landoni, M. F.; Aliabadi, M. H. S.; Toutain, P. L. y Lees, P. (2011). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in calves. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. **34(4): 376 – 387.**
- Singh, V.; Ram, M.; Roy, B. K. y Singh, K. K. (2010). Effect of induced mastitis on disposition kinetics of gatifloxacin following intravenous administration in goats. Journal of Bioanalysis and Biomedicine. **2(2): 44 – 47.**
- Singh, R. y Tam, V. H. (2011) Optimizing dosage to prevent emergence of resistance – lessons from in vitro models. Current Opinion in Pharmacology. **11: 453 – 456.**
- Smith, M. C. y Sherman, D. M. (2009). Mammary gland and milk production. In: Smith, M. C. y Sherman, D. M. Goat medicine 2nd edition. Wiley – Blackwell. Ames, Iowa, U.S.A. **647 – 690.**

- Thomas, V.; de Jong, A.; Moyaert, H.; Simjee, S.; El Garch, F.; Morrissey, I.; Marion, H. y Vall, M. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **46**: 13 – 20.
- Toutain, P. L.; Del Castillo, J. R. E. y Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*. **73**: 105–114.
- Toutain, P. L. y Bousquet-Mélou, A. (2004a). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **27(6)**: 415 – 25.
- Toutain, P. L. y Bousquet-Mélou, A. (2004b). Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **27(6)**: 441 – 53.
- Toutain, P. L. y Bousquet-Mélou, A. (2004c). Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **27(6)**: 455 – 66.
- Toutain, P. L. y Bousquet-Mélou, A. (2004d). Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **27(6)**: 427 – 439.
- Toutain, P. L. (2009). Mechanism of drug action and pharmacokinetics/pharmacodynamics integration in dosage regimen optimization for veterinary medicine. In: Riviere, J. E. y Papich, M. G. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9th edition. Wiley – Blackwell. Ames, Iowa, U.S.A. **75 – 97**.
- USP. (2007). United States Pharmacopeia Convention. FLUOROQUINOLONES (Veterinary—Systemic).
<http://c.ymcdn.com/sites/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/fluoroquinolones.pdf>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Valle', M.; Schneider, M.; Galland, D.; Giboin, H. y Woehrle', F. (2011). Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **35(6)**: 519 – 528.

- Van Doorslaer, X.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H. y Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Science of The Total Environment*. **500-501**: 250 – 269.
- Varon, E.; Janoir, C.; Kitzis, M. D. y Gutmann, L. (1999). ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43(2)**: 302 – 306.
- Verma, D. K y Roy, B. K. (2006). Milk kinetics of gatifloxacin after single dose intravenous administration in healthy and febrile goats. *Indian Journal of Pharmacology*. **38(5)**: 366 – 367.
- VICH. (1998). Validation of analytical procedures: Methodology. GL 2/ 1998. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052379.pdf>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- VICH. (2000). Guidelines on Good Clinical Practice (GCP). Topic GL 9. CVMP/VICH/595/98-FINAL. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004343.pdf. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- VICH. (2008). Target animal safety for veterinary pharmaceutical products. GL 43/2008. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052464.pdf>. Consultado: 20 de octubre de 2015.
- Walker, R. D. y Dowling, P. M. (2006). Fluoroquinolones. In: Giguère, S.; Prescott, J. F.; Baggot, J. D.; Walker, R. D. y Dowling, P. M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 4th edition. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, U.S.A. **263 – 284**.
- Waxman, S.; Rodríguez, C.; González, F.; De Vicente, M. L.; San Andrés, M. I. y San Andrés, M. D. (2001). Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **24(6)**: 375 – 78.

- Waxman, S.; San Andrés, M. D.; González, F.; San Andrés, M. I.; De Lucas, J. J. y Rodríguez, C. (2004). Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*. **27(1): 31 – 35**.
- Waxman, S.; San Andrés, M. D.; González, F.; San Andrés, M. I.; de Lucas, J. J. y Rodríguez, C. (2007). Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after subcutaneous administration in goats. *The Veterinary Journal*. **174: 425 – 27**.
- Wasyl, D.; Hoszowski, A. y Zajac, M. (2014). Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Veterinary Microbiology* **171: 307 – 314**.
- Wetzstein, H. G. (2005). Comparative mutant prevention concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49(10): 4166 – 4173**.
- Wright, D. H.; Brown, G. H.; Peterson, M. L. y Rotschafer, J. C. (2000). Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. **46: 669 – 683**.
- Xiao, X. y Xiao, Y. (2008). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antofloxacin hydrochloride in a neutropenic murine thigh model of *Staphylococcus aureus* infection. *Acta Pharmacologica Sinica*. **29(10): 1253 – 1260**.
- Yohannes, S.; Hossaim, A.; Kim, J.; Lee, S.; Kwak, D.; Suh, J. y Park, S. (2014). Allometric scaling of marbofloxacin pharmacokinetics: a retrospective analysis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **17(1): 99 – 103**.

VIII. Anexo

8. ANEXO

Tabla 66: datos de linealidad del método cromatográfico para la determinación de marbofloxacin en suero de cabras. Rango de concentraciones bajas.

Concentración patrón	Relación AUCm/AUCo	Concentración calculada	Exactitud
0,025	0,060	0,019	0,761
0,025	0,062	0,021	0,824
0,025	0,063	0,021	0,839
0,025	0,064	0,022	0,867
0,025	0,065	0,022	0,883
0,025	0,055	0,016	0,648
0,025	0,060	0,019	0,761
0,025	0,062	0,021	0,824
0,025	0,063	0,021	0,839
0,025	0,064	0,022	0,867
0,025	0,065	0,022	0,883
0,025	0,055	0,016	0,648
0,025	0,074	0,028	1,117
0,025	0,072	0,026	1,052
0,025	0,060	0,019	0,763
0,025	0,062	0,020	0,810
0,025	0,058	0,018	0,720
0,025	0,064	0,022	0,865
0,025	0,061	0,020	0,796
0,025	0,058	0,018	0,719
0,025	0,062	0,021	0,824
0,025	0,063	0,021	0,839
0,025	0,064	0,022	0,867
0,025	0,065	0,022	0,883
0,050	0,090	0,037	0,750
0,050	0,085	0,035	0,692
0,050	0,113	0,052	1,036
0,050	0,106	0,047	0,943
0,050	0,096	0,041	0,828
0,050	0,094	0,040	0,799
0,100	0,229	0,123	1,226
0,100	0,217	0,115	1,154
0,100	0,239	0,129	1,289
0,100	0,212	0,112	1,123
0,100	0,211	0,112	1,119
0,100	0,187	0,097	0,968
0,500	0,791	0,468	0,936
0,500	0,801	0,474	0,948
0,500	0,874	0,519	1,037
0,500	0,857	0,508	1,017
0,500	0,863	0,512	1,024
0,500	0,857	0,508	1,016

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación lineal, obtenida a partir de la recta de ajuste resultante de la relación entre las AUC de MFX y OFX (AUCMFX/OFX) y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. $\text{Concentración} = (\text{MFX}/\text{OFX} - 0,0289)/1,63$.

Tabla 67: datos de linealidad del método cromatográfico, para la determinación de marbofloxacin en suero de cabras. Rango de concentraciones altas.

Concentración patrón	Relación AUCm/AUCo	Concentración calculada	Exactitud
1,000	1,569	1,001	1,001
1,000	1,853	1,174	1,174
1,000	1,456	0,932	0,932
1,000	1,881	1,191	1,191
1,000	1,889	1,195	1,195
1,000	1,668	1,061	1,061
2,500	3,859	2,393	0,957
2,500	4,070	2,521	1,008
2,500	4,040	2,503	1,001
2,500	4,062	2,516	1,006
2,500	3,898	2,416	0,967
2,500	3,936	2,440	0,976
5,000	7,901	4,849	0,970
5,000	7,853	4,820	0,964
5,000	8,130	4,988	0,998
5,000	7,770	4,769	0,954
5,000	8,101	4,971	0,994
5,000	7,504	4,608	0,922
10,000	17,495	10,680	1,068
10,000	15,972	9,754	0,975
10,000	16,260	9,929	0,993
10,000	16,158	9,867	0,987
10,000	15,929	9,728	0,973
10,000	16,356	9,987	0,999
15,000	25,194	15,358	1,024
15,000	23,332	14,227	0,948
15,000	23,363	14,246	0,950
15,000	25,170	15,344	1,023
15,000	26,271	16,013	1,068
15,000	24,875	15,165	1,011

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación lineal, obtenida a partir de la recta de ajuste resultante de la relación entre las AUC de MFX y OFX (AUCMFX/OFX) y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. Concentración = (AUCm/AUCo – 0,0782)/1,6455

Tabla 68: variación intradía del método cromatográfico, para la determinación de marbofloxacin en suero de cabras.

Concentración patrón	AUCm/AUCo		
	Mañana	Tarde	Noche
0,025	0,060	0,063	0,065
0,025	0,062	0,064	0,055
0,500	0,791	0,874	0,863
0,500	0,801	0,857	0,857
2,500	3,859	4,040	3,898
2,500	4,070	4,062	3,936

Para el cálculo de la variación intradía se utilizaron dos determinaciones en tres momentos del día (mañana, tarde y noche), para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 69: variación interdía del método cromatográfico, para la determinación de marbofloxacin en suero de cabras.

Concentración patrón	AUCm/AUCo		
	Día 1	Día 2	Día 3
0,025	0,060	0,074	0,064
0,025	0,062	0,072	0,049
0,025	0,063	0,055	0,056
0,025	0,064	0,060	0,061
0,025	0,065	0,062	0,058
0,025	0,055	0,058	0,048
0,500	0,791	0,819	0,766
0,500	0,801	0,811	0,803
0,500	0,874	0,777	0,771
0,500	0,857	0,727	0,782
0,500	0,863	0,714	0,777
0,500	0,857	0,751	0,752
2,500	3,859	3,802	3,944
2,500	4,070	3,930	3,939
2,500	4,040	3,968	3,834
2,500	4,062	3,951	3,796
2,500	3,898	3,605	3,726
2,500	3,936	3,847	3,700

Para el cálculo de la variación interdía se utilizaron seis determinaciones en tres días consecutivos para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 70: datos de linealidad del método cromatográfico, para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras. Rango de concentraciones bajas.

Concentración patrón	Relación AUC _m /AUC _o	Concentración calculada	Exactitud
0,025	0,043	0,024	0,963
0,025	0,036	0,020	0,793
0,025	0,037	0,020	0,805
0,025	0,029	0,016	0,627
0,025	0,040	0,022	0,877
0,025	0,040	0,022	0,888
0,025	0,045	0,025	1,008
0,025	0,045	0,025	1,001
0,025	0,043	0,024	0,968
0,025	0,045	0,025	1,010
0,025	0,050	0,028	1,121
0,025	0,049	0,028	1,109
0,025	0,043	0,024	0,963
0,025	0,036	0,020	0,793
0,025	0,037	0,020	0,805
0,025	0,029	0,016	0,627
0,025	0,040	0,022	0,877
0,025	0,040	0,022	0,888
0,025	0,036	0,020	0,798
0,025	0,033	0,018	0,712
0,025	0,042	0,024	0,940
0,025	0,039	0,021	0,851
0,025	0,050	0,028	1,132
0,025	0,037	0,020	0,819
0,050	0,087	0,050	1,001
0,050	0,085	0,048	0,966
0,050	0,083	0,048	0,951
0,050	0,080	0,046	0,912
0,050	0,078	0,044	0,888
0,050	0,076	0,043	0,863
0,100	0,192	0,114	1,143
0,100	0,172	0,102	1,018
0,100	0,183	0,109	1,088
0,100	0,199	0,119	1,188
0,100	0,187	0,111	1,114
0,100	0,182	0,109	1,085
0,500	0,814	0,497	0,994
0,500	0,815	0,498	0,995
0,500	0,828	0,506	1,011
0,500	0,847	0,518	1,035
0,500	0,807	0,493	0,985
0,500	0,788	0,481	0,961

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación lineal, obtenida a partir de la recta de ajuste resultante de la relación entre las AUC de MFX y OFX (AUC_{MFX}/OFX) y las concentraciones conocidas de los patrones de leche. Concentración = (AUC_m/AUC_o – 0,006)/1,6257

Tabla 71: datos de linealidad del método cromatográfico para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras. Rango de concentraciones altas.

Concentración patrón	Relación AUC _m /AUC _o	Concentración calculada	Exactitud
1,000	1,738	1,062	1,062
1,000	1,568	0,955	0,955
1,000	1,771	1,083	1,083
1,000	1,837	1,124	1,124
1,000	1,900	1,163	1,163
1,000	1,777	1,086	1,086
2,500	3,846	2,384	0,954
2,500	3,936	2,441	0,976
2,500	3,511	2,174	0,870
2,500	3,621	2,244	0,897
2,500	3,997	2,479	0,992
2,500	3,926	2,435	0,974
5,000	7,617	4,751	0,950
5,000	7,537	4,700	0,940
5,000	7,521	4,690	0,938
5,000	7,751	4,835	0,967
5,000	7,382	4,603	0,921
5,000	7,840	4,891	0,978
10,000	15,947	9,977	0,998
10,000	16,322	10,212	1,021
10,000	16,954	10,609	1,061
10,000	15,481	9,684	0,968
10,000	15,427	9,651	0,965
10,000	16,217	10,146	1,015

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación lineal, obtenida a partir de la recta de ajuste resultante de la relación entre las AUC de MFX y OFX (AUC_{MFX}/OFX) y las concentraciones conocidas de los patrones de leche. Concentración = (AUC_m/AUC_o – 0,0456)/1,5938

Tabla 72: variación intradía del método cromatográfico para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras.

Concentración patrón	AUCm/AUCo		
	Mañana	Tarde	Noche
0,025	0,060	0,063	0,065
0,025	0,062	0,064	0,055
0,500	0,791	0,874	0,863
0,500	0,801	0,857	0,857
2,500	3,859	4,040	3,898
2,500	4,070	4,062	3,936

Para el cálculo de la variación intradía se utilizaron dos determinaciones en tres momentos del día (mañana, tarde y noche), para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 73: variación interdía del método cromatográfico, para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras.

Concentración patrón	AUCm/AUCo		
	Día 1	Día 2	Día 3
0,025	0,045	0,043	0,036
0,025	0,045	0,036	0,033
0,025	0,043	0,037	0,042
0,025	0,045	0,029	0,039
0,025	0,050	0,040	0,050
0,025	0,049	0,040	0,037
0,500	0,766	0,814	0,773
0,500	0,733	0,815	0,757
0,500	0,719	0,828	0,811
0,500	0,681	0,847	0,825
0,500	0,719	0,807	0,740
0,500	0,698	0,788	0,713
2,500	4,133	3,846	4,190
2,500	3,925	3,936	4,079
2,500	3,993	3,511	3,870
2,500	3,947	3,621	4,011
2,500	4,016	3,997	3,816
2,500	3,944	3,926	3,687

Para el cálculo de la variación interdía se utilizaron seis determinaciones en tres días consecutivos para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 74: datos de linealidad del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacin en suero de cabras. Concentraciones entre 0,049 – 0,780.

Concentrac ión patrón	Diámetr o	Concentrac ión calculada	Exactitu d	Concentrac ión patrón	Diámetr o	Concentrac ión calculada	Exactitu d
0,049	9,390	0,047	0,950	0,195	16,082	0,338	1,735
0,049	9,630	0,050	1,020	0,195	14,468	0,210	1,076
0,049	8,620	0,037	0,756	0,195	14,219	0,195	0,999
0,049	9,360	0,046	0,942	0,195	14,420	0,207	1,060
0,049	8,990	0,041	0,844	0,195	14,101	0,188	0,965
0,049	8,750	0,039	0,786	0,195	14,371	0,204	1,045
0,049	8,740	0,038	0,784	0,195	15,100	0,253	1,297
0,049	8,820	0,039	0,802	0,195	14,500	0,212	1,086
0,049	8,750	0,039	0,786	0,195	13,350	0,151	0,772
0,049	8,900	0,040	0,822	0,195	14,580	0,217	1,112
0,049	9,560	0,049	0,999	0,390	17,474	0,511	1,311
0,049	9,260	0,045	0,914	0,390	16,684	0,404	1,037
0,049	8,560	0,036	0,743	0,390	16,054	0,336	0,860
0,049	8,790	0,039	0,795	0,390	15,819	0,313	0,802
0,049	9,280	0,045	0,920	0,390	16,670	0,403	1,033
0,049	8,950	0,041	0,834	0,390	16,186	0,349	0,895
0,049	9,190	0,044	0,895	0,390	17,150	0,464	1,191
0,049	9,010	0,042	0,849	0,390	17,170	0,467	1,198
0,098	12,619	0,121	1,237	0,390	16,450	0,377	0,968
0,098	12,931	0,133	1,357	0,390	16,010	0,331	0,849
0,098	11,982	0,100	1,024	0,780	19,080	0,823	1,055
0,098	12,398	0,114	1,158	0,780	18,686	0,732	0,939
0,098	12,633	0,122	1,242	0,780	20,417	1,223	1,568
0,098	12,356	0,112	1,144	0,780	18,388	0,670	0,859
0,098	12,170	0,106	1,083	0,780	19,371	0,897	1,150
0,098	12,170	0,106	1,083	0,780	19,840	1,031	1,321
0,098	11,620	0,090	0,920	0,780	20,070	1,103	1,415
0,098	11,610	0,090	0,917	0,780	20,640	1,307	1,675
				0,780	18,630	0,720	0,923
				0,780	18,910	0,782	1,003

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación logarítmica obtenida a partir de la recta de ajuste resultante entre la relación de diámetros de halo y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. Concentración = $e^{(Diámetro - 19,738)/3,3738}$

Tabla 75: datos de linealidad del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacina en suero de cabras. Concentraciones entre 1,560 – 12,500.

Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud	Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud
1,560	20,666	1,317	0,844	6,250	26,780	8,063	1,290
1,560	20,964	1,438	0,922	6,250	26,210	6,809	1,090
1,560	22,944	2,587	1,658	6,250	25,220	5,078	0,812
1,560	22,411	2,209	1,416	6,250	26,490	7,399	1,184
1,560	20,978	1,444	0,926	6,250	25,130	4,944	0,791
1,560	21,359	1,617	1,036	6,250	27,100	8,865	1,418
1,560	23,060	2,677	1,716	6,250	24,970	4,715	0,754
1,560	22,260	2,112	1,354	6,250	25,890	6,193	0,991
1,560	21,360	1,617	1,037	6,250	25,580	5,650	0,904
1,560	22,080	2,002	1,283	12,500	28,637	13,980	1,118
3,125	22,993	2,624	0,840	12,500	27,820	10,974	0,878
3,125	23,498	3,048	0,975	12,500	27,530	10,070	0,806
3,125	23,160	2,757	0,882	12,500	28,210	12,319	0,985
3,125	23,790	3,324	1,064	12,500	28,990	15,523	1,242
3,125	23,760	3,294	1,054	12,500	27,681	10,531	0,843
3,125	23,471	3,023	0,968	12,500	28,640	13,993	1,119
3,125	23,580	3,123	0,999	12,500	27,520	10,040	0,803
3,125	24,660	4,301	1,376	12,500	27,440	9,805	0,784
3,125	22,980	2,614	0,837	12,500	27,290	9,379	0,750
3,125	22,940	2,583	0,827	12,500	28,480	13,345	1,068
6,250	24,918	4,643	0,743	12,500	27,430	9,776	0,782
6,250	25,640	5,751	0,920	12,500	28,130	12,030	0,962
6,250	26,010	6,418	1,027	12,500	29,010	15,615	1,249
6,250	26,088	6,568	1,051	12,500	27,190	9,105	0,728
6,250	25,895	6,202	0,992	12,500	28,340	12,803	1,024
6,250	26,421	7,249	1,160	12,500	27,750	10,749	0,860
6,250	25,150	4,974	0,796	12,500	27,080	8,813	0,705
6,250	25,940	6,286	1,006				
6,250	25,960	6,323	1,012				

Las concentraciones calculadas se realizaron en base a la ecuación logarítmica obtenida a partir de la recta de ajuste resultante entre la relación de diámetros de halo y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. $\text{Concentración} = e^{(\text{Diámetro} - 19,738)/3,3738}$

Tabla 76: variación intradía del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacina en suero de cabras.

Concentración patrón	Diámetro (mm)		
	Mañana	Tarde	Noche
0,049	9,390	8,620	8,990
0,049	9,630	9,360	8,750
6,250	24,918	26,010	25,895
6,250	25,640	26,088	26,421
12,500	28,637	27,530	28,990
12,500	27,820	28,210	27,681

Para el cálculo de la variación intradía se utilizaron dos determinaciones en tres momentos del día (mañana, tarde y noche), para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 77: variación interdía del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacina en suero de cabras.

Concentración patrón	Diámetro (mm)		
	Día 1	Día 2	Día 3
12,500	28,637	28,640	28,130
12,500	27,820	27,520	29,010
12,500	27,530	27,440	27,190
12,500	28,210	27,290	28,340
12,500	28,990	28,480	27,750
12,500	27,681	27,430	27,080
6,250	24,918	25,150	26,490
6,250	25,640	25,940	25,130
6,250	26,010	25,960	27,100
6,250	26,088	26,780	24,970
6,250	25,895	26,210	25,890
6,250	26,421	25,220	25,580
0,049	9,390	8,740	8,560
0,049	9,630	8,820	8,790
0,049	8,620	8,750	9,280
0,049	9,360	8,900	8,950
0,049	8,990	9,560	9,190
0,049	8,750	9,260	9,010

Para el cálculo de la variación interdía se utilizaron seis determinaciones en tres días consecutivos para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 78: datos de linealidad del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacina en leche de cabras. Concentraciones entre 0,098 – 1,560.

Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud	Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud
0,098	10,942	0,080	0,818	0,390	18,480	0,314	0,806
0,098	11,160	0,083	0,851	0,390	18,120	0,295	0,755
0,098	11,477	0,088	0,901	0,390	20,930	0,490	1,257
0,098	12,330	0,103	1,052	0,390	20,850	0,483	1,239
0,098	11,770	0,093	0,950	0,390	19,600	0,385	0,988
0,098	9,600	0,063	0,641	0,390	20,430	0,448	1,148
0,098	10,470	0,074	0,751	0,390	20,850	0,483	1,239
0,098	11,200	0,084	0,857	0,390	20,730	0,473	1,212
0,098	11,010	0,081	0,828	0,390	21,102	0,506	1,297
0,098	10,510	0,074	0,756	0,390	21,039	0,500	1,282
0,098	10,680	0,076	0,780	0,780	25,820	1,190	1,526
0,098	11,215	0,084	0,859	0,780	25,960	1,221	1,565
0,098	11,016	0,081	0,829	0,780	24,380	0,917	1,175
0,098	11,315	0,086	0,875	0,780	25,950	1,219	1,562
0,098	10,917	0,080	0,814	0,780	25,630	1,150	1,474
0,098	10,781	0,078	0,794	0,780	24,220	0,890	1,142
0,098	10,745	0,077	0,789	0,780	24,640	0,961	1,232
0,098	10,528	0,074	0,758	0,780	24,870	1,002	1,284
0,195	15,930	0,198	1,015	0,780	25,562	1,136	1,456
0,195	15,560	0,185	0,949	0,780	24,539	0,944	1,210
0,195	15,310	0,177	0,907	1,560	28,550	1,953	1,252
0,195	15,060	0,169	0,867	1,560	28,860	2,066	1,324
0,195	15,630	0,188	0,962	1,560	28,760	2,029	1,300
0,195	17,340	0,256	1,311	1,560	27,370	1,577	1,011
0,195	16,740	0,229	1,176	1,560	28,430	1,911	1,225
0,195	16,620	0,224	1,151	1,560	28,850	2,062	1,322
0,195	15,213	0,174	0,892	1,560	26,570	1,364	0,874
0,195	15,476	0,182	0,935	1,560	26,490	1,344	0,862
				1,560	29,649	2,383	1,528
				1,560	28,350	1,883	1,207

Las concentraciones calculadas, se realizaron en base a la ecuación logarítmica obtenida a partir de la recta de ajuste, resultante entre la relación de diámetros de halo y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. $\text{Concentración} = e^{(\text{Diámetro} - 24,86)/5,5211}$

Tabla 79: datos de linealidad del método microbiológico, para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras. Concentraciones entre 3,125 – 12,500.

Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud	Concentración patrón	Diámetro (mm)	Concentración calculada	Exactitud
3,125	32,820	4,236	1,356	12,500	38,155	11,146	0,892
3,125	32,120	3,731	1,194	12,500	37,206	9,385	0,751
3,125	30,380	2,721	0,871	12,500	38,397	11,648	0,932
3,125	31,880	3,572	1,143	12,500	38,190	11,217	0,897
3,125	32,460	3,968	1,270	12,500	38,650	12,194	0,975
3,125	30,700	2,884	0,923	12,500	38,239	11,318	0,905
3,125	31,880	3,572	1,143	12,500	37,710	10,283	0,823
3,125	30,320	2,692	0,861	12,500	37,780	10,414	0,833
3,125	32,825	4,240	1,357	12,500	37,300	9,546	0,764
3,125	31,812	3,528	1,129	12,500	36,560	8,347	0,668
6,250	34,953	6,237	0,998	12,500	38,510	11,888	0,951
6,250	34,278	5,519	0,883	12,500	38,380	11,611	0,929
6,250	35,890	7,392	1,183	12,500	38,678	12,256	0,980
6,250	34,980	6,267	1,003	12,500	37,819	10,489	0,839
6,250	34,640	5,893	0,943	12,500	37,538	9,967	0,797
6,250	34,920	6,200	0,992	12,500	38,421	11,699	0,936
6,250	34,120	5,362	0,858	12,500	36,880	8,846	0,708
6,250	35,840	7,325	1,172	12,500	38,361	11,571	0,926
6,250	34,930	6,211	0,994				
6,250	34,630	5,882	0,941				
6,250	34,720	5,979	0,957				
6,250	34,752	6,013	0,962				
6,250	35,349	6,701	1,072				
6,250	33,920	5,171	0,827				
6,250	35,460	6,837	1,094				
6,250	34,070	5,314	0,850				
6,250	34,993	6,282	1,005				
6,250	34,680	5,936	0,950				

Las concentraciones calculadas, se realizaron en base a la ecuación logarítmica obtenida a partir de la recta de ajuste resultante, entre la relación de diámetros de halo y las concentraciones conocidas de los patrones de suero. $Concentración = e^{(Diámetro - 24,86)/5,5211}$

Tabla 80: variación intradía del método microbiológico para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras.

Concentración patrón	Diámetro (mm)		
	Mañana	Tarde	Noche
0,098	10,942	11,477	11,770
0,098	11,160	12,330	9,600
6,250	34,953	35,890	34,640
6,250	34,278	34,980	34,920
12,500	38,155	38,397	38,650
12,500	37,206	38,190	38,239

Para el cálculo de la variación intradía, se utilizaron dos determinaciones en tres momentos del día (mañana, tarde y noche), para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 81: variación interdía del método microbiológico para la determinación de marbofloxacin en leche de cabras.

Concentración patrón	Diámetro (mm)		
	Día 1	Día 2	Día 3
12,500	38,155	37,710	38,678
12,500	37,206	37,780	37,819
12,500	38,397	37,300	37,538
12,500	38,190	36,560	38,421
12,500	38,650	38,510	36,880
12,500	38,239	38,380	38,361
6,250	34,953	34,120	35,349
6,250	34,278	35,840	33,920
6,250	35,890	34,930	35,460
6,250	34,980	34,630	34,070
6,250	34,640	34,720	34,993
6,250	34,920	34,752	34,680
0,098	10,942	10,470	11,016
0,098	11,160	11,200	11,315
0,098	11,477	11,010	10,917
0,098	12,330	10,510	10,781
0,098	11,770	10,680	10,745
0,098	9,600	11,215	10,528

Para el cálculo de la variación interdía, se utilizaron seis determinaciones en tres días consecutivos, para tres concentraciones (bajas, intermedias y altas).

Tabla 82: concentraciones séricas de marbofloxacin (µg/ml) tras administración intravenosa, a dosis única, de 5 mg/kg.

Tiempo (h)	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,033	13,735	13,781	10,269	10,269	8,252	9,275	10,930	2,314
0,100	8,442	10,176	7,342	7,626	6,126	7,788	7,916	1,343
0,200	7,501	7,241	6,627	6,380	5,464	6,337	6,592	0,725
0,333	6,518	6,034	6,272	5,906	4,646	5,175	5,758	0,709
0,500	5,680	5,422	5,692	5,136	3,754	4,867	5,092	0,729
0,750	4,526	4,447	5,218	4,765	3,279	4,023	4,376	0,666
1,000	3,948	3,966	5,128	3,627	2,675	3,215	3,760	0,830
1,500	3,526	3,403	4,466	3,479	1,980	2,685	3,256	0,844
2,000	2,727	2,735	3,809	2,984	1,440	2,082	2,629	0,806
3,000	2,048	2,182	2,889	2,230	0,992	1,503	1,974	0,654
4,000	1,497	1,752	2,230	1,553	0,666	1,003	1,450	0,552
6,000	0,861	1,024	1,634	1,050	0,449	0,546	0,927	0,425
8,000	0,563	0,691	1,245	0,682	0,345	0,248	0,629	0,351
10,000	0,373	0,469	0,946	0,371	0,235	0,161	0,426	0,277
12,000	0,214	0,272	0,760	0,251	0,153	0,113	0,294	0,236
24,000	0,036	0,044	0,110	-	-	-	0,063	0,040
36,000	-	-	0,038	-	-	-	0,038	-
48,000	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 83: concentraciones lácteas de marbofloxacin (µg/ml), tras administración intravenosa, a dosis única, de 5 mg/kg.

Tiempo (h)	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,000	3,727	2,820	3,840	3,147	2,153	2,509	3,033	0,669
4,000	2,663	2,617	2,900	2,722	1,319	1,650	2,312	0,657
6,000	1,399	1,593	1,893	1,270	0,484	0,791	1,238	0,520
8,000	0,767	0,966	1,513	0,813	0,167	0,307	0,756	0,484
10,000	0,437	0,624	1,195	0,382	0,095	0,200	0,489	0,392
12,000	0,296	0,432	0,904	0,221	0,069	0,172	0,349	0,298
24,000	0,067	0,096	0,151	0,054	-	0,041	0,082	0,044
36,000	0,025	0,031	0,056	-	-	-	0,037	0,016
48,000	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 84: concentraciones séricas de marbofloxacin (µg/ml), tras administración intramuscular, a dosis única, de 5 mg/kg.

Tiempo (h)	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,167	3,878	2,446	2,913	1,533	1,525	4,410	2,459	0,994
0,333	4,647	2,969	4,113	2,886	2,251	4,598	3,373	0,979
0,500	5,073	4,173	3,908	2,944	2,356	4,538	3,691	1,064
0,750	4,971	4,555	4,209	3,714	2,813	4,681	4,052	0,833
1,000	4,620	4,510	4,310	3,677	2,673	4,133	3,958	0,806
1,500	4,179	4,076	4,305	3,523	2,463	3,365	3,709	0,758
2,000	3,170	3,410	3,444	2,920	2,442	2,706	3,077	0,413
3,000	2,320	2,722	3,283	2,072	1,621	1,591	2,404	0,633
4,000	1,486	2,170	2,783	1,847	1,137	1,033	1,885	0,634
6,000	0,897	1,292	2,172	1,263	0,808	0,599	1,287	0,540
8,000	0,527	0,866	1,437	0,691	0,512	0,361	0,806	0,380
10,000	0,251	0,719	1,047	0,426	0,345	0,179	0,558	0,325
12,000	0,153	0,244	0,673	0,216	0,184	0,112	0,294	0,214
24,000	0,029	0,056	0,110	0,042	0,040	-	0,056	0,032
36,000	-	-	0,027	-	-	-	0,027	-
48,000	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 85: concentraciones lácteas de marbofloxacin (µg/ml), tras administración intramuscular, a dosis única, de 5 mg/kg.

Tiempo (h)	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,000	4,405	3,653	3,824	3,664	1,483	2,997	3,886	0,354
4,000	2,295	3,039	3,272	2,774	1,597	1,622	2,845	0,419
6,000	1,176	1,698	1,877	1,392	0,701	0,826	1,536	0,313
8,000	0,733	0,948	0,773	0,623	0,351	0,452	0,769	0,135
10,000	0,417	0,593	0,365	0,310	0,175	0,271	0,421	0,122
12,000	0,231	0,421	0,233	0,206	0,130	0,179	0,273	0,100
24,000	0,050	0,068	0,034	0,044	-	0,034	0,049	0,014
36,000	-	0,029	-	-	-	-	0,029	-
48,000	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 86: concentraciones séricas de marbofloxacin (µg/ml), tras administración intramuscular de dosis múltiples de 10 mg/kg/día.

	Tiempo (h)	Animal							Media	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,167	7,204	7,079	6,285	6,057	4,244	3,439	2,930	5,320	1,757
	0,333	12,475	7,353	7,475	6,858	4,673	5,942	4,786	7,080	2,637
	0,500	13,349	12,084	14,343	9,047	5,269	5,608	4,966	9,238	4,047
	0,750	12,760	13,011	11,730	11,900	4,974	4,680	5,138	9,170	3,993
	1,000	12,134	12,398	9,822	9,741	4,646	4,605	4,327	8,239	3,621
	1,500	11,706	11,491	8,604	9,311	4,611	4,444	4,417	7,798	3,283
	2,000	8,955	8,542	7,460	7,226	4,653	3,860	3,912	6,373	2,184
	4,000	4,662	3,813	3,202	4,169	2,896	3,091	2,649	3,497	0,735
	6,000	1,711	2,576	1,671	2,220	2,649	2,318	2,257	2,200	0,383
	8,000	1,040	1,351	0,890	1,494	1,999	1,395	1,984	1,450	0,425
	10,000	0,775	1,219	0,567	0,863	1,781	0,789	1,137	1,019	0,403
	12,000	0,600	0,841	0,397	0,593	1,162	0,587	0,770	0,707	0,246
	24,000	0,172	0,211	0,099	0,162	0,222	0,115	0,114	0,156	0,049
Día 2	24,500	7,693	7,058	14,285	13,376	5,246	4,132	4,276	8,009	4,199
	24,750	12,159	8,586	12,259	11,718	3,872	3,918	4,096	8,087	4,052
	25,000	10,673	11,682	9,563	11,646	3,832	3,521	3,742	7,808	3,910
	26,000	7,029	9,495	7,685	8,258	3,820	2,261	2,819	5,910	2,887
	36,000	0,809	1,023	0,399	0,621	1,742	1,310	0,977	0,983	0,445
	48,000	0,196	0,225	0,105	0,199	0,406	0,233	0,184	0,221	0,091
Día 3	48,167	6,317	6,746	9,761	3,222	2,435	1,840	1,873	4,599	3,051
	48,333	12,694	9,302	7,853	4,979	2,904	2,315	2,542	6,084	3,985
	48,500	9,731	8,464	7,211	5,461	2,828	5,608	4,981	6,326	2,319
	48,750	7,391	7,545	7,022	6,823	6,175	3,500	2,264	5,817	2,083
	49,000	9,321	7,058	6,038	7,369	4,352	2,996	2,127	5,609	2,572
	49,500	9,475	6,501	5,760	10,640	3,798	2,188	2,002	5,766	3,389
	50,000	8,818	6,595	5,129	9,882	2,078	2,075	1,873	5,207	3,355
	52,000	5,187	4,268	3,189	5,483	1,613	1,259	1,639	3,234	1,780
	54,000	2,342	2,576	1,517	3,209	1,596	1,336	1,506	2,012	0,706
	56,000	1,207	1,230	0,561	1,109	1,356	1,303	1,344	1,159	0,277
	58,000	0,558	0,575	0,305	0,680	1,299	0,981	0,881	0,754	0,327
	60,000	0,395	0,358	0,214	0,448	1,150	0,458	0,485	0,501	0,300
	72,000	0,149	0,126	0,110	0,188	0,323	0,138	0,119	0,165	0,075

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 86 (continuación): concentraciones séricas de marbofloxacin (µg/ml) tras administración intramuscular de dosis múltiples de 10 mg/kg/día.

	Tiempo (h)	Animal							Media	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 4	72,500	6,844	7,197	4,798	5,784	2,251	1,719	1,799	4,342	2,395
	72,750	7,460	7,934	4,629	7,917	2,534	1,999	2,254	4,961	2,767
	73,000	7,338	7,204	4,725	6,837	4,694	4,066	2,471	5,334	1,842
	74,000	6,356	5,557	4,749	5,964	1,848	1,912	1,854	4,034	2,081
	84,000	0,546	0,538	0,363	0,541	1,536	0,804	0,597	0,704	0,389
	96,000	0,172	0,138	0,102	0,196	0,250	0,145	0,115	0,160	0,051
Día 5	96,167	4,379	3,778	5,140	3,416	1,799	1,646	1,572	3,104	1,443
	96,333	8,855	7,406	8,403	6,291	1,999	2,497	2,346	5,400	3,030
	96,500	7,693	8,140	7,772	6,753	6,650	4,404	4,151	6,509	1,619
	96,750	6,986	6,542	7,717	7,958	7,098	6,202	5,534	6,862	0,847
	97,000	5,574	6,382	5,922	4,156	6,039	5,033	4,182	5,327	0,895
	97,500	5,140	5,825	5,551	4,605	4,444	4,219	3,687	4,782	0,760
	98,000	4,225	4,948	5,241	4,207	2,725	3,480	3,275	4,014	0,909
	100,000	2,917	2,811	2,393	3,596	2,435	3,373	2,549	2,868	0,467
	102,000	1,426	1,251	0,907	1,868	2,150	2,681	1,502	1,684	0,597
	104,000	0,877	0,911	0,617	1,028	1,731	1,540	1,112	1,117	0,390
	106,000	0,674	0,647	0,407	1,542	1,266	0,968	0,610	0,873	0,406
	108,000	0,397	0,380	0,252	1,005	0,699	0,371	0,315	0,488	0,268
	120,000	0,162	0,175	0,103	0,305	0,184	0,154	0,139	0,175	0,063
Día 6	132,000	-	0,110	-	0,050	0,060	0,051	-	0,068	0,028
	144,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 87: concentraciones lácteas de marbofloxacin (µg/ml), tras administración intramuscular de dosis múltiples de 10 mg/kg/día; presentes en medios mamarios sanos.

	Tiempo	Animal							Media	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1,000	3,323	3,088	1,526	1,488	2,963	4,833	0,808	2,576	1,383
	2,000	5,036	4,078	3,452	3,326	4,913	5,258	2,373	4,062	1,070
	4,000	4,012	3,894	3,246	4,562	4,522	2,973	3,288	3,785	0,633
	6,000	3,430	3,880	2,909	4,012	4,281	1,716	2,056	3,183	0,995
	8,000	1,714	3,430	2,073	2,249	3,042	0,959	2,043	2,216	0,820
	10,000	1,207	2,970	1,402	1,652	1,722	0,567	1,428	1,564	0,727
	12,000	0,415	2,054	1,143	1,279	1,313	0,419	0,862	1,069	0,573
	24,000	0,158	0,255	0,176	0,238	0,369	0,116	0,137	0,207	0,088
Día 2	25,000	5,478	3,668	3,105	2,019	7,067	3,912	2,444	3,956	1,772
	26,000	5,312	5,054	3,648	2,640	5,573	3,801	3,670	4,243	1,081
	36,000	1,521	2,989	1,665	1,564	2,419	1,177	1,161	1,785	0,676
	48,000	0,240	0,395	0,155	0,301	0,394	0,216	0,173	0,268	0,099
Día 3	49,000	5,385	3,094	0,963	0,425	1,321	2,051	0,606	1,978	1,761
	50,000	6,112	3,602	2,030	0,850	2,717	3,730	1,775	2,974	1,719
	54,000	7,136	4,416	2,762	2,058	3,581	2,753	2,538	3,606	1,737
	56,000	4,100	3,030	2,362	2,345	2,927	2,284	2,160	2,744	0,685
	58,000	2,482	2,319	1,712	1,435	2,833	1,603	1,759	2,021	0,523
	60,000	1,509	1,892	1,335	1,243	1,951	0,834	1,156	1,417	0,401
	62,000	1,157	1,472	1,026	1,116	1,311	0,612	0,718	1,059	0,306
	72,000	0,172	0,168	0,124	0,241	0,372	0,153	0,149	0,197	0,085
Día 4	73,000	4,052	2,416	0,465	0,393	1,840	3,403	1,153	1,960	1,416
	74,000	5,508	3,550	1,476	0,694	3,146	4,493	2,116	2,998	1,696
	84,000	1,315	1,628	1,245	1,945	1,365	0,796	0,874	1,310	0,401
	96,000	0,204	0,189	0,110	0,353	0,226	0,140	0,137	0,194	0,082
Día 5	97,000	3,187	1,005	1,554	1,707	0,700	0,756	0,904	1,402	0,877
	98,000	5,068	2,903	2,674	2,726	1,586	4,032	2,684	3,096	1,123
	100,000	3,030	2,723	2,286	3,085	2,807	3,465	1,473	2,696	0,649
	102,000	2,989	2,730	2,030	2,976	2,491	2,077	1,558	2,407	0,539
	104,000	1,816	2,096	1,583	3,823	1,701	1,483	1,244	1,964	0,862
	106,000	1,272	1,673	1,132	2,983	1,378	0,806	1,019	1,466	0,723
	108,000	0,970	1,116	0,755	1,967	0,789	0,521	0,580	0,957	0,491
	120,000	0,155	0,304	0,123	0,407	0,225	0,163	0,124	0,214	0,106
Día 6	132,000	0,089	0,186	0,059	0,109	-	0,051	0,051	0,091	0,052
	144,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 88: concentraciones lácteas de marbofloxacina (µg/ml) tras administración intramuscular de dosis múltiples de 10 mg/kg/día; presentes en medios mamarios enfermos.

	Tiempo	Animal							Media	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1,000	5,385	2,516	2,405	0,640	2,493	3,721	0,841	2,572	1,633
	2,000	8,057	4,209	3,359	2,324	3,655	3,625	2,077	3,901	1,984
	4,000	5,188	3,796	2,959	3,246	3,823	2,189	2,393	3,371	1,019
	6,000	3,789	3,461	2,425	2,760	3,243	1,451	2,308	2,777	0,797
	8,000	2,171	3,167	1,653	2,640	2,580	0,932	2,015	2,166	0,731
	10,000	1,421	2,353	1,242	2,471	1,969	0,616	1,550	1,660	0,654
	12,000	0,892	1,806	0,721	1,826	1,428	0,414	0,930	1,145	0,549
	24,000	0,166	0,276	0,085	0,490	0,352	0,102	0,189	0,237	0,146
Día 2	25,000	4,752	2,631	3,731	3,153	5,868	3,095	1,247	3,497	1,491
	26,000	5,307	3,249	3,508	3,308	4,841	3,931	2,252	3,771	1,032
	36,000	1,597	1,744	0,881	2,427	2,612	0,872	1,108	1,606	0,709
	48,000	0,231	0,282	0,092	0,797	0,500	0,190	0,240	0,333	0,239
Día 3	49,000	6,041	3,489	1,008	1,051	1,604	2,174	0,726	2,299	1,898
	50,000	6,185	3,320	2,491	1,946	3,305	3,065	1,672	3,140	1,491
	54,000	4,896	3,455	3,161	2,851	2,937	2,742	2,463	3,215	0,805
	56,000	3,641	2,516	2,288	4,255	3,072	2,153	2,149	2,868	0,822
	58,000	2,643	2,412	1,793	3,055	2,976	1,734	1,639	2,322	0,601
	60,000	1,947	2,142	1,152	2,616	2,471	0,945	1,486	1,823	0,646
	62,000	1,136	1,347	0,790	2,197	1,782	0,589	0,981	1,260	0,566
	72,000	0,186	0,183	0,083	0,574	0,519	0,150	0,179	0,268	0,195
Día 4	73,000	3,455	2,919	0,644	1,000	1,702	2,123	1,254	1,871	1,028
	74,000	6,309	4,333	1,513	1,750	2,966	3,188	1,956	3,145	1,707
	84,000	1,401	1,907	0,926	2,016	2,273	0,768	0,691	1,426	0,648
	96,000	0,248	0,211	0,102	0,622	0,398	0,155	0,152	0,270	0,182
Día 5	97,000	3,124	1,744	0,974	1,594	1,263	2,364	1,318	1,769	0,743
	98,000	5,212	2,445	3,102	1,994	3,219	3,820	2,582	3,196	1,068
	100,000	3,362	3,852	3,293	2,301	3,622	2,757	1,530	2,960	0,819
	102,000	3,455	3,013	2,576	2,775	2,568	2,413	1,557	2,622	0,585
	104,000	2,496	2,657	1,856	3,060	3,097	1,351	1,364	2,269	0,747
	106,000	1,509	1,974	1,269	2,569	2,528	1,035	0,976	1,694	0,671
	108,000	0,991	1,472	0,802	2,036	1,739	0,654	0,566	1,180	0,572
	120,000	0,194	0,271	0,116	0,725	0,385	0,162	0,126	0,283	0,217
Día 6	132,000	0,098	0,168	0,053	0,219	0,122	0,054	0,054	0,110	0,065
	144,000	-	-	-	0,099	-	-	-	0,099	-

DS: desviación estándar. (-): concentración por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 89: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en suero, tras administración intravenosa, a dosis única, de 5 mg/kg.

Parámetro	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
Constante λ_e	0,168	0,168	0,129	0,250	0,181	0,259	0,192	0,051
$t_{1/2\lambda_e}$	4,136	4,119	5,362	2,777	3,834	2,680	3,818	0,995
C_0 (µg/ml)	7,955	7,652	7,630	6,089	7,817	6,965	7,352	0,706
$AUC_{(0-t)}$ (µg*h/ml)	20,579	22,247	33,214	19,496	11,265	13,905	20,118	7,663
AUC_{∞} (µg*h/ml)	20,794	22,511	33,506	20,502	12,111	14,341	20,627	7,503
V_d (l/kg)	1,435	1,320	1,155	0,977	2,284	1,348	1,420	0,454
V_{ss} (l)	0,946	0,958	0,935	0,910	1,545	0,988	1,047	0,245
MRT (h)	3,932	4,312	6,266	3,730	3,742	2,833	4,136	1,151
Cl (ml*kg/min)	4,008	3,702	2,487	4,065	6,881	5,811	4,492	1,582

Constante λ_e : constante de eliminación; $t_{1/2\lambda_e}$: semivida de eliminación; C_0 : concentración inicial; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; V_d : volumen de distribución aparente calculado en base al área; V_{ss} : volumen de distribución aparente en estado estacionario; MRT: tiempo medio de residencia; Cl: aclaramiento plasmático total. DS: desviación estándar.

Tabla 90: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en leche, tras administración intravenosa, a dosis única, de 5 mg/kg.

Parámetro	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
Constante λ_a	0,917	0,765	1,837	0,838	0,975	0,973	1,051	0,394
Constante λ_e	0,109	0,115	0,120	0,133	0,120	0,115	0,119	0,008
$t_{1/2\lambda_a}$	0,755	0,906	0,377	0,827	0,711	0,712	0,715	0,182
$t_{1/2\lambda_e}$	6,331	6,021	5,753	5,229	5,762	6,049	5,857	0,375
C_{max} (µg/ml)	3,727	2,820	3,840	3,147	2,153	2,509	3,033	0,669
T_{max} (h)	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	0,000
$AUC_{(0-t)}$ (µg*h/ml)	21,012	21,596	31,162	18,537	9,019	12,370	18,949	7,778
AUC_{∞} (µg*h/ml)	21,241	21,864	31,625	18,942	9,161	12,732	19,261	7,852
MRT (h)	6,303	7,396	8,266	5,770	4,624	5,808	6,361	1,294

Constantes λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; MRT: tiempo medio de residencia. DS: desviación estándar.

Tabla 91: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en suero, tras administración intramuscular, a dosis única, de 5 mg/kg.

Parámetro	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
Constante λ_a	5,264	3,485	3,606	3,429	3,518	3,462	3,794	0,723
Constante λ_e	0,148	0,169	0,140	0,155	0,144	0,282	0,173	0,055
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,132	0,199	0,192	0,202	0,197	0,200	0,187	0,027
MAT (h)	-0,057	0,612	0,205	1,165	1,403	0,199	0,588	0,585
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	4,676	4,100	4,962	4,476	4,811	2,454	4,247	0,928
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	5,073	4,555	4,310	3,714	2,813	4,681	4,191	0,811
T_{max} (h)	0,500	0,750	1,000	0,750	0,750	0,750	0,750	0,158
$AUC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	19,066	22,968	32,354	18,978	14,077	14,410	20,309	6,769
AUC_{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	19,263	23,300	32,548	19,252	14,357	14,808	20,588	6,726
MRT (h)	3,876	4,925	6,470	4,894	5,145	3,033	4,724	1,173
F (%)	0,926	1,032	0,974	0,973	1,250	1,036	1,032	0,114

Constantes λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; MAT: tiempo medio de absorción; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; MRT: tiempo medio de residencia. DS: desviación estándar.

Tabla 92: Índices lácteos de marbofloxacin en leche y suero, tras administración intravenosa e intramuscular, a dosis única, de 5 mg/kg.

Índice lácteo	Animal						Media	DS
	1	2	3	4	5	6		
Intravenosa								
AUC _(0-t) leche/suero	1,021	0,971	0,938	0,951	0,801	0,890	0,929	0,076
t _{1/2λe} leche/suero	1,531	1,462	1,073	1,883	1,503	2,257	1,618	0,405
MRT leche/suero	1,603	1,715	1,319	1,547	1,236	2,050	1,578	0,292
Intramuscular								
AUC _(0-t) leche/suero	1,048	1,036	0,682	1,013	0,621	0,957	0,893	0,191
t _{1/2λe} leche/suero	1,035	1,436	0,838	1,138	0,577	1,956	1,163	0,484
MRT leche/suero	1,367	1,340	0,793	1,080	0,967	1,759	1,218	0,344

DS: desviación estándar.

Tabla 93: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en suero tras administración intramuscular, a dosis múltiple, de 10 mg/kg/día.

	Parámetro	Animal							Medi a	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	λ_a	2,224	3,015	4,720	3,961	2,132	6,930	5,912	4,128	1,838
	λ_e	0,106	0,122	0,122	0,116	0,145	0,137	0,162	0,130	0,019
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,312	0,230	0,147	0,175	0,325	0,100	0,117	0,201	0,091
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	6,524	5,690	5,689	5,994	4,779	5,053	4,272	5,429	0,770
	C_{max} (µg/ml)	13,34 9	13,01 1	14,34 3	11,90 0	5,269	5,942	5,138	9,850	4,185
	T_{max} (h)	0,500	0,750	0,500	0,750	0,500	0,333	0,750	0,583	0,167
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	52,45 4	54,31 8	41,55 1	46,96 2	41,80 8	32,65 9	34,45 6	43,45 8	8,318
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	54,07 6	56,05 1	42,36 1	48,36 2	43,33 9	33,49 6	35,16 2	44,69 2	8,698
	MRT (h)	4,803	5,409	4,200	5,217	7,341	5,949	6,306	5,603	1,035
Día 3	λ_a	7,993	13,97 8	17,64 8	1,202	1,213	0,548	1,401	6,283	7,066
	λ_e	0,090	0,101	0,067	0,085	0,102	0,126	0,134	0,101	0,023
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,087	0,050	0,039	0,577	0,571	1,264	0,495	0,440	0,439
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	7,704	6,859	10,36 2	8,132	6,824	5,489	5,163	7,219	1,753
	C_{max} (µg/ml)	12,69 4	9,302	9,761	10,64 0	6,175	5,608	4,981	8,452	2,902
	T_{max} (h)	0,333	0,333	0,167	1,500	0,750	0,500	0,500	0,583	0,444
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	48,54 5	41,02 7	31,05 3	49,86 8	30,86 9	21,33 4	21,32 4	34,86 0	11,88 2
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	50,19 8	42,27 4	32,69 5	52,06 8	34,05 4	22,42 5	22,20 8	36,56 0	12,15 3
	MRT (h)	4,953	5,056	5,468	5,659	10,04 5	7,538	7,385	6,586	1,854
Día 5	λ_a	6,365	10,94 8	7,629	6,921	0,869	2,357	2,573	5,380	3,577
	λ_e	0,101	0,083	0,090	0,091	0,129	0,111	0,093	0,100	0,016
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,109	0,063	0,091	0,100	0,797	0,294	0,269	0,246	0,260
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	6,873	8,327	7,694	7,598	5,385	6,243	7,472	7,084	0,997
	C_{max} (µg/ml)	8,855	8,140	8,403	7,958	7,098	6,202	5,534	7,456	1,223
	T_{max} (h)	0,333	0,500	0,333	0,750	0,750	0,750	0,750	0,595	0,201
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	31,03 5	31,63 6	28,37 9	39,07 2	32,84 5	32,15 0	24,99 1	31,44 4	4,318
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	32,64 1	33,74 2	29,52 0	42,41 9	34,27 2	33,53 9	26,48 8	33,23 1	4,924
	MRT (h)	6,076	6,512	4,959	8,536	7,102	6,497	6,837	6,645	1,082

Constantes λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; MRT: tiempo medio de residencia. DS: desviación estándar.

Tabla 94: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en leche, tras una administración intramuscular a dosis múltiple de 10 mg/kg/día; presentes en medios mamarios sanos.

	Parámetro	Animal							Medi	DS
		1	2	3	4	5	6	7	a	
Día 1	λ_a	1,548	0,424	0,853	1,601	0,593	1,212	0,571	0,972	0,484
	λ_e	0,140	0,175	0,151	0,139	0,108	0,111	0,163	0,141	0,025
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,448	1,633	0,812	0,433	1,168	0,572	1,214	0,897	0,456
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	4,955	3,964	4,592	4,985	6,388	6,222	4,260	5,052	0,930
	C_{max} (µg/ml)	5,036	4,078	3,452	4,562	4,913	5,258	3,288	4,369	0,781
	T_{max} (h)	2,000	2,000	2,000	4,000	2,000	2,000	4,000	2,571	0,976
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	35,456	53,462	35,023	41,810	48,871	28,778	28,856	38,894	9,576
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	36,586	54,922	36,189	43,522	52,276	29,817	29,697	40,430	10,169
	MRT (h)	6,453	8,376	8,043	8,278	8,893	5,963	8,002	7,715	1,080
Día 3	λ_a	1,050	0,441	0,425	0,430	2,310	3,432	0,521	1,230	1,187
	λ_e	0,156	0,176	0,172	0,121	0,114	0,119	0,141	0,143	0,026
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,660	1,572	1,632	1,611	0,300	0,202	1,330	1,044	0,637
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	4,435	3,944	4,026	5,734	6,092	5,802	4,905	4,991	0,891
	C_{max} (µg/ml)	7,136	4,416	2,762	2,345	3,581	3,730	2,538	3,787	1,651
	T_{max} (h)	4,000	4,000	4,000	6,000	4,000	2,000	4,000	4,000	1,155
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	54,141	43,124	28,274	25,119	39,385	27,797	24,414	34,608	11,235
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	55,244	44,080	28,993	27,114	42,653	29,075	25,465	36,089	11,305
	MRT (h)	6,434	7,641	8,175	10,630	10,043	7,559	8,553	8,434	1,465
Día 5	λ_a	2,318	0,990	1,139	0,277	0,402	0,764	0,445	0,905	0,700
	λ_e	0,100	0,075	0,106	0,121	0,121	0,097	0,101	0,103	0,016
	$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	0,299	0,700	0,608	2,500	1,724	0,907	1,557	1,185	0,773
	$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	6,963	9,282	6,523	5,748	5,743	7,153	6,842	6,893	1,194
	C_{max} (µg/ml)	5,068	2,903	2,674	3,823	2,807	4,032	2,684	3,427	0,912
	T_{max} (h)	2,000	2,000	2,000	8,000	4,000	2,000	2,000	3,143	2,268
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	38,188	36,379	26,747	50,837	26,709	28,377	21,363	32,657	9,926
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	39,082	38,870	27,302	51,742	28,577	28,904	21,866	33,763	10,094
	MRT (h)	8,177	12,241	8,684	10,381	9,505	8,007	9,059	9,436	1,478

Constantes λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; MRT: tiempo medio de residencia. DS: desviación estándar.

Tabla 95: parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en leche, tras una administración intramuscular a dosis múltiple, de 10 mg/kg/día; presentes en medios mamarios enfermos.

	Parámetro	Animal							Medi a	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	λ_a	1,260	0,723	0,811	0,488	0,810	1,722	0,460	0,896	0,450
	λ_e	0,149	0,154	0,187	0,113	0,121	0,124	0,144	0,142	0,025
	$t_{1/2\lambda a}$ (h)	0,550	0,958	0,854	1,420	0,856	0,402	1,508	0,935	0,410
	$t_{1/2\lambda e}$ (h)	4,660	4,490	3,713	6,107	5,738	5,576	4,805	5,013	0,834
	C_{max} (µg/ml)	8,057	4,209	3,359	3,246	3,823	3,721	2,393	4,115	1,829
	T_{max} (h)	2,000	2,000	2,000	4,000	4,000	1,000	4,000	2,714	1,254
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	49,851	48,686	29,561	42,084	43,317	23,040	28,130	37,810	10,738
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	50,968	50,473	30,018	46,405	46,233	23,861	29,441	39,629	11,405
	MRT (h)	6,139	8,534	6,756	11,295	9,267	6,391	8,933	8,188	1,870
Día 3	λ_a	1,428	0,559	0,665	0,308	0,779	1,225	0,360	0,761	0,424
	λ_e	0,162	0,173	0,188	0,110	0,108	0,126	0,148	0,145	0,031
	$t_{1/2\lambda a}$ (h)	0,485	1,240	1,042	2,247	0,889	0,566	1,927	1,200	0,666
	$t_{1/2\lambda e}$ (h)	4,282	4,014	3,689	6,324	6,393	5,516	4,682	4,986	1,100
	C_{max} (µg/ml)	6,185	3,489	3,161	4,255	3,305	3,065	2,463	3,703	1,218
	T_{max} (h)	2,000	1,000	4,000	6,000	2,000	2,000	4,000	3,000	1,732
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	50,643	40,043	27,564	48,345	45,060	26,937	26,643	37,891	10,654
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	51,792	41,101	28,006	53,583	49,851	28,127	27,851	40,044	11,932
	MRT (h)	6,673	7,874	7,293	11,620	11,083	7,637	9,063	8,749	1,925
Día 5	λ_a	2,221	0,467	0,685	6,921	0,493	1,106	0,603	1,785	2,347
	λ_e	0,096	0,090	0,113	0,091	0,111	0,104	0,098	0,101	0,009
	$t_{1/2\lambda a}$ (h)	0,312	1,483	1,011	0,100	1,405	0,627	1,150	0,870	0,536
	$t_{1/2\lambda e}$ (h)	7,187	7,661	6,119	7,598	6,259	6,668	7,075	6,938	0,611
	C_{max} (µg/ml)	5,212	3,852	3,293	7,958	3,622	3,820	2,582	4,334	1,782
	T_{max} (h)	2,000	4,000	4,000	0,750	4,000	2,000	2,000	2,679	1,313
	AUC_{0-t} (µg*h/ml)	42,444	42,969	30,938	39,072	47,249	30,053	21,840	36,366	9,006
	AUC_{∞} (µg*h/ml)	43,461	44,826	31,406	42,419	48,350	30,573	22,392	37,632	9,525
	MRT (h)	8,393	10,786	8,143	8,536	10,420	7,986	9,031	9,042	1,121

Constantes λ_a y λ_e : constantes de absorción y eliminación; $t_{1/2\lambda_a}$ y $t_{1/2\lambda_e}$: semividas de absorción y eliminación; C_{max} : concentración máxima observada; T_{max} : tiempo al que se alcanza la C_{max} ; $AUC_{(0-t)}$: área bajo la curva del área observada a las 24 horas; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada al infinito; MRT: tiempo medio de residencia. DS: desviación estándar.

Tabla 96: Índices lácteos de marbofloxacin en leche y suero, tras una administración intramuscular a dosis múltiple de 10 mg/kg/día. Medios mamarios sanos.

Índice lácteo		Animal							Medi a	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	AUC _(0-t) leche/suero	0,676	0,984	0,843	0,890	1,169	0,881	0,837	0,897	0,151
	t _{1/2λe} leche/suero	0,760	0,697	0,807	0,832	1,337	1,231	0,997	0,951	0,247
	MRT leche/suero	1,344	1,549	1,915	1,587	1,212	1,002	1,269	1,411	0,299
Día 3	AUC _(0-t) leche/suero	1,115	1,051	0,911	0,504	1,276	1,303	1,145	1,043	0,273
	t _{1/2λe} leche/suero	0,576	0,575	0,389	0,705	0,893	1,057	0,950	0,735	0,240
	MRT leche/suero	1,299	1,511	1,495	1,879	1,000	1,003	1,158	1,335	0,318
Día 5	AUC _(0-t) leche/suero	1,230	1,150	0,942	1,301	0,813	0,883	0,855	1,025	0,198
	t _{1/2λe} leche/suero	1,013	1,115	0,848	0,757	1,067	1,146	0,916	0,980	0,145
	MRT leche/suero	1,346	1,880	1,751	1,216	1,338	1,232	1,325	1,441	0,263

DS: desviación estándar.

Tabla 97: Índices lácteos de marbofloxacin en leche y suero, tras una administración intramuscular a dosis múltiple de 10 mg/kg/día. Medios mamarios enfermos.

Índice lácteo		Animal							Medi a	DS
		1	2	3	4	5	6	7		
Día 1	AUC _(0-t) leche/suero	0,950	0,896	0,711	0,896	1,036	0,705	0,816	0,859	0,122
	t _{1/2λe} leche/suero	0,714	0,789	0,653	1,019	1,201	1,103	1,125	0,943	0,220
	MRT leche/suero	1,278	1,578	1,609	2,165	1,262	1,074	1,417	1,483	0,354
Día 3	AUC _(0-t) leche/suero	1,043	0,976	0,888	0,969	1,460	1,263	1,249	1,121	0,206
	t _{1/2λe} leche/suero	0,556	0,585	0,356	0,778	0,937	1,005	0,907	0,732	0,239
	MRT leche/suero	1,347	1,558	1,334	2,054	1,103	1,013	1,227	1,377	0,347
Día 5	AUC _(0-t) leche/suero	1,368	1,358	1,090	1,000	1,439	0,935	0,874	1,152	0,232
	t _{1/2λe} leche/suero	1,046	0,920	0,795	1,000	1,162	1,068	0,947	0,991	0,118
	MRT leche/suero	1,381	1,656	1,642	1,000	1,467	1,229	1,321	1,385	0,232

DS: desviación estándar.



Doctorado

VETERINARIA

